

平成 20 年
(2009 年 3 月)

卒業論文

湿原水溶存有機物の特性

その地域差と季節変化

畜産科学科 生態系環境科学ユニット 環境土壌学研究室

吉田 恵美

目次

第1章 緒論	4
第2章 試料及び実験方法.....	7
2-1 湿原水試料	7
2-2 pH・EC.....	13
2-3 全有機炭素	13
2-4 濃縮・精製方法	13
2-5 ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC)	13
2-5-1 分子量検量線.....	14
2-5-2 平均分子量.....	14
2-6 溶出液の分光分析および含有成分の吸光度法による分析.....	15
2-6-1 紫外・可視吸光度法	15
2-6-2 フェノール (フォリン法) の定量.....	15
2-6-3 タンパク質様物質 (Bradford 法) の定量.....	16
2-6-4 糖 (フェノール硫酸法・アンスロン法) の定量.....	16
2-6-5 有機炭素 (立川法) の定量.....	16
2-7 糖組成分析	17
2-8 赤外線吸収スペクトル.....	19
2-9 元素分析	19
2-10 3次元蛍光スペクトル	19
2-10-1 蛍光インデックス	20

第3章 結果及び考察.....	21
3-1 pH・EC.....	21
3-2 全有機炭素 (TOC)	21
3-3 ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC)	23
3-3-1 分子量検量線.....	28
3-3-2 平均分子量.....	31
3-4 溶出液の分光分析および含有成分の吸光度法による分析.....	33
3-4-1 紫外・可視吸光度法による溶出曲線.....	33
3-4-2 フェノール性化合物 (フォリン法) の溶出曲線.....	36
3-4-3 タンパク質様物質 (Bradford 法) の溶出曲線.....	37
3-4-4 糖 (フェノール硫酸法・アンスロン法) の溶出曲線.....	42
3-4-5 有機炭素 (立川法) の溶出曲線.....	49
3-5 糖組成分析.....	53
3-6 赤外線吸収スペクトル.....	59
3-7 元素分析.....	62
3-8 3次元蛍光スペクトル.....	68
3-8-1 蛍光インデックス.....	74
第4章 要約.....	77
謝辞.....	79
参考文献.....	80
付図.....	84

第1章 緒論

湿原とは、地下水位が高い環境に成立した植物のまとまりである。湿原は、希少な水鳥や多くの動植物の生息地である。また、湿原は、安定した水の供給、水質の浄化、生物圏における物質循環などに寄与している（辻井，2007）。

湿原生態系の生物地球化学的過程においては、溶存有機物（DOM）が大きく関与している。DOMは、元素循環、微生物のエネルギー、地域の物質の移動を含む水環境中の生物地球化学的過程で重要な機能をする。DOMの濃度と構造は直接的、間接的の両方で水環境の生物的（微生物とプランクトンの生態）、化学的（微量金属の溶解と運搬、多環式芳香族炭化水素の毒性）、物理的（光学特性）に影響する。多くの淡水と沿岸水では、DOMの主な起源は、陸上植物の分解で、それは水系と河川を通して海環境へ溶解・運搬される。DOMは異なる反応性や生態学的役割をもつ（Maie et al. 2006; Stedmon et al. 2003）。陸上の植物と土壌から由来したDOMの流れは、陸上の炭素収支で重要な要因であり、陸上と水生生態系の間での物質とエネルギーの移動媒体として貢献している（Jaffé et al. 2008）。

しかし、DOMの機能は組成・構造特性によって大きく異なる。したがって、湿原生態系の物質循環過程を理解するには、DOMの構造特性と機能性および安定性（分解性）との関係を明確にしておく必要がある。

湿原は、温帯から寒帯まで世界各地に分布し、タイプが多様なためDOMの組成や構造特性、さらにはそれに起因する機能性などが異なる可能性がある。したがって、湿原生態系の物質循環、生物地球化学的過程を地球レベルで評価するためには、各気候帯におけるDOMの量的および質的特性を知る必要がある。DOMの量的および質的特性は変動しやすく、生態系動態に関係した季節変化で示されるため、季節変化を明らかにすることも重要となる。本研究では、

マレーシア・サラワク州（熱帯）と北海道東部（冷温帯）において湿原水から DOM 試料を調整した後、各種解析を行い、各気候帯湿原における DOM の特性、その地域差と季節変化を明らかにする。

DOM の起源と特性の理解には、様々な解析手法が用いられている。DOM の分子量・分子量分布は、DOM の物理化学的な特徴を理解するため重要である。DOM の分子量・分子量分布は、流域の植生、機構、土壌等により異なり、微量金属元素との錯形成の支配因子の 1 つと考えられている。DOM の分子量・分子量分布は、広い範囲を示し、DOM の構造特性と密接に関連しているため、DOM の特徴の簡易比較項目として用いられる。そこで、ゲル浸透クロマトグラフィーにより DOM の分子量・分子量分布を測定する。

DOM は異なる有機化合物群から構成され、複雑な化学構造を有している。DOM は生物を構成する有機物（生物体有機物）とは大きく異なり、「化学構造が特定される有機物質（タンパク質、アミノ酸、炭水化物、脂質など）」の占める割合が少なく、大部分は「化学構造が特定されていない有機物質」によって占められているといわれている。そのため、溶存有機物の研究は XAD8 および PVP などの吸着樹脂に吸着させて回収した腐植物質について主に進められており、共存する非腐植物質成分の実際の構成割合を詳細に分析した研究はほとんど見られない。本研究では、腐植物質成分のみにとどまらず、各種の非腐植物質構成成分も視野にいれて分析を行う。

DOM の化学的性質は、光学特性によって定義され、光学測定は、天然水中での DOM の変動性を調べるのに利用されている。DOM の光学特性はとても変わりやすく、異なる物理的（例：水文学）、化学的（例：光反応／酸化還元状態）、生物学的（例：一次生産力）過程によって支配され、重要な生態学的影響をもつ(Jaffé et al. 2008)。DOM の構造には、不飽和脂肪族化合物、芳香族化合物等の蛍光を有している。3次元蛍光スペクトルは、DOM の光学活性画分である発

色溶存有機物 (CDOM) を特徴づける手段として使われる。たとえば、3次元蛍光スペクトルは、陸と海由来の CDOM を区別するのに利用され、海由来 CDOM は陸由来 CDOM より短波長で蛍光強度の最大をもつ。DOM の由来をあらわす単純な指標として蛍光インデックス (FI) が用いられている。たとえば、フロリダ湾の河口域での FI は、陸上の植物由来 DOM は低い値で示され、強い微生物由来 DOM はとても高い値で示されている (McKnight et al. 2001)。また、乾季で高く雨季で低くなるという季節性も示されている (Maie et al. 2006)。3次元蛍光スペクトルは、多量の情報を含み、環境間で異なり、溶存有機物の蛍光特性の全体像を把握することができる。また、3次元蛍光スペクトルをかいせきすることにより、溶存有機物に含まれる様々な腐植物質および非腐植物質成分を個別に評価することができる。そこで、本研究では 3次元蛍光スペクトルも分析手段の一つに加えた。

第2章 試料及び実験方法

2-1 湿原水試料

マレーシア（熱帯）の試料は、マレーシアのボルネオ島サラワク州・ムカ（図 1-1）において、ムカ川の支流である Lebang 川と Bakong 川の 2 地点で 2007 年 12 月（雨季）と 2008 年 8 月（乾季）に採取した。採取地点は、図 1-2 に示す地点である。Bakong 川はオイルパームプランテーションの開発により熱帯湿地林が大規模に伐採された地域を流れる川、Lebang 川は自然状態に近い湿地林を流れる川であり、採取地点より上流の集水域はほとんど自然のままの湿地林である。両採取地点の土壌はどちらも木質泥炭土壌である。

日本（冷温帯）の試料は、北海道東部の 4 地点から採取した（図 2-1）。4 地点はいずれも草本由来の泥炭地に属する。

北海道東部の浜中町にある霧多布湿原は、太平洋に面して海岸沿いに発達した湿原である。北部に源流をもち、霧多布湿原の中を 8 キロ南下し琵琶瀬の集落で海に注いでいる泥川で、2007 年 8 月・11 月、2008 年 6 月に採取した。採取地点は、MG ロードが泥川の上を通り抜ける地点の東側である。

北海道東部の厚岸町にある別寒辺牛湿原は、厚岸湖に注ぐ別寒辺牛川本流とその支流域に細長く発達した湿原である。別寒辺牛川の支流であるチライカリベツ川で、2007 年 8 月・11 月、2008 年 6 月・9 月に採取した。採取地点は、図 2-2 に示す地点である。十勝川河口域湖沼群では、2 地点で採取した。キモントウ沼は海岸から 5 キロほど内陸の丘陵地に囲まれた谷の中にある湿原である。キモントウ沼へ流入する河川を紀文沼橋から 2007 年 8 月と 11 月、2008 年 4 月と 9 月に採取し、キモントウ沼から流出する河川を沼川橋から 2007 年 8 月と 11 月、2008 年 4 月に採取した。採取地点は、図 2-3 に示した。



図 1-1. マレーシア試料採取場所



図 1-2. マレーシア試料採取場所 詳細地図



図 2-1. 北海道試料採取場所



図 2-2. 北海道試料採取場所 霧多布湿原、別寒辺牛湿原



図 2-3. 北海道試料採取場所 十勝川河口域湖沼群

2-2 pH・EC

pH・ECは、グラスファイバーフィルターAdvantec GB-140 (0.5 μ m) でろ過した溶液について、常法により測定した。

2-3 全有機炭素

全有機炭素は、名古屋大学大学院生命農学研究科渡辺彰准教授に分析して頂いた。

2-4 濃縮・精製方法

各採取場所で20m L容ポリタンク3つ(計60m L)に水を採取し、実験室に運んだ。まず、あらかじめ450°Cで4時間燃焼したグラスファイバーフィルター(Advantec GB-140)でろ過し、0.5 μ m画分以上の分子を除去した。次に、ミリポア社のTFF(Tangential Flow Filtration)モジュールPellicon Mini2を使い、まずDURAPORE 0.22 μ m PVDF Type C Membraneを用いて粒子サイズ0.22 μ m以上の画分を除去し、続いてPLAC 1K Type C Membraneを用いて1kD画分以上(分子量1000以上)の画分を濃縮した。これらの作業は氷冷しながら行った。濃縮した試料は、さらに超純水で精製し、0.2 μ mのメンブレンフィルターを通過させた後、凍結乾燥した。

2-5 ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)

分画分子量範囲の異なる2種類のToyopearl HW型ゲルを用いてGPCを行った。

濃縮・精製した試料(10mg)を、10m Lの溶離液(0.033M ホウ酸リチウム(イオン強度0.1、pH9.2))に溶かし、約500mgのBIO-RAD Chelex 100 Resin(100-200 mesh)を添加してよく振り混ぜたのち、0.45 μ mメンブレンフィ

ルター (径 25mm) でろ過し、1m Lを Toyopearl-HW65S カラム (内径 15mm、長さ 460mm 分子量 4 万～500 万相当) および Toyopearl-HW50F カラム (内径 15mm、長さ 460mm 分子量 500～8 万相当) に流し、流速 1.0mL min^{-1} (微量定量ポンプ) で溶離した。溶出曲線は、UV 検出器 (ファルマシア社 UV-1) を使い 254nm の吸光度を 30 秒毎に測定し記録した。データの記録は全アナログ計測変換器 (アズワン VZAK-01) により行った。カラムを通過した溶液は、フラクションコレクターにより、2.5m L ずつ試験管に分取した。

2-5-1 分子量検量線

分子量校正用試料 SIGMA MW-GF-70kit およびトリプトファンを用いて、検量線を作成した。使用した標準試料は以下の通りである。Bluedextran (分子量 200 万)、Albumin (分子量 66000)、Carbonic-anhydrase (分子量 29000)、Cytochrom (分子量 12400)、Vitamin B12 (分子量 1355)、Tryptophane (分子量 204)。

2-5-2 平均分子量

Toyopearl HW65S カラムでの重量平均分子量 (M_n) と数平均分子量 (M_w)、多分散性を以下の計算式により求めた。

i 番目のフラクションについて

V_i : 溶出容積

M_i : 分子量既知の標品 (SIGMA-MW-GF-70Kit) で作成した検量線

$$y = -0.0672 x + 8.3780 \quad R^2 = 0.9923$$

によって計算した V_i に対応する分子量

(ただし、 $y = \log M_i$ 、 $x = V_i$ とした)

A_i : 吸光度 (ベースライン補正を行った吸光度)

S : 溶存成分の溶出の始まったフラクション

E : 溶存成分の溶出の終わったフラクション

とすると、

重量平均分子量 (M_n)

$$M_n = \frac{\sum_S^E [M_i \times (1000 \times A_i)]}{\sum_S^E (1000 \times A_i)}$$

数平均分子量 (M_w)

$$M_w = \frac{\sum_S^E [M_i \times (1000 \times A_i / M_i)]}{\sum_S^E (1000 \times A_i / M_i)}$$

多分散性 (M_w/M_n)

2-6 溶出液の分光分析および含有成分の吸光度法による分析

Toyopearl-HW50F カラムで分取したフラクションを用いて、島津紫外可視分光光度計 UV mini-1240 で測定した。

2-6-1 紫外・可視吸光度法

フラクションコレクターにより分取した試料を UV セルにとり、250・280・400nm の吸光度を測定した。腐植化度の目安として、吸光度 400nm/250nm の比率を求めた。

2-6-2 フェノール (フォリン法) の定量

フラクションコレクターにより分取した試料から各 1 mL をマイクロセルにとり、2 倍希釈したフォリンのフェノール試薬 (関東化学 特級試薬) を 100 μ L 加え、恒温機 (30°C) 中で 30 分放置した。飽和炭酸ナトリウム溶液 (80g/200mL) の上澄液を 100 μ L 加え、恒温機 (30°C) 中で 30 分放置後、760 nm の吸光度を測定した。スタンダードは、フェノール 10.3ppm を使用した。

2-6-3 タンパク質様物質 (Bradford 法) の定量

フラクションコレクターにより分取した試料から各 800 μ L をマイクロセルにとり、Bio-Rad Protein Assay の試薬を 200 μ L 加え、5 分以上 1 時間以内に 595nm の吸光度を測定した。スタンダードは、ウシ血清アルブミン (BSA) 13.6ppm を使用した。

2-6-4 糖 (フェノール硫酸法・アンスロン法) の定量

1) フェノール硫酸法

フラクションコレクターにより分取した試料から各 800 μ L を試験管にとり、80%フェノールを 20 μ L 加えた。硫酸 2mL を加え、ミキサーで攪拌した後、アルミブロックヒーター (100°C) で 10 分温め、冷めてからディスポセルに移し、490nm の吸光度を測定した。スタンダードは、グルコース 5ppm と 10ppm を使用した。

2) アンスロン法

フラクションコレクターにより分取した試料から各 1mL を試験管にとり、0.2%アンスロン硫酸溶液を 2mL 加え、ミキサーで攪拌した後、アルミブロックヒーター (100°C) で 10 分温め、冷めてからディスポセルに移し、625nm の吸光度を測定した。スタンダードは、グルコース 5ppm と 10ppm を使用した。

2-6-5 有機炭素 (立川法) の定量

フラクションコレクターにより分取した試料から各 1mL を試験管にとり、0.5N 重クロム酸硫酸混液を 2mL 加え、ミキサーで攪拌した後、アルミブロックヒーター (100°C) で 30 分温め、冷めてからディスポセルに移し、645nm の吸光度を測定した。スタンダードは、グルコース 499ppm を使用した。

2-7 糖組成分析

試料の加水分解および還元アセチル化

濃縮・精製した試料（10mg）をキャップ付ガラス遠心管にとり、72%硫酸（w/w）125 μ L 加え、攪拌し溶解を助けた。室温で45分放置後、蒸留水 1.35mL を加え硫酸濃度を1Mにし、ブロックヒーター（100℃）で3時間加熱した。内部標準として、Mio-Inositol（5mg/mL）を25 μ L 添加した。この試料溶液を遠心分離にかけ、上澄みを XAD7HP カラム（ムロマックミニカラム L に約 4mL 充填したもの）に通過させ着色している腐植物質やフェノール物質を除去した。試料が残っている遠心管に蒸留水を適量加え、再び遠心分離にかけ、上澄みを XAD7HP カラムに通過させた。通過液は、50mL 容プラスチック遠心管に集め、小さな攪拌子を添加してマグネチックスターラーで攪拌しながら飽和水酸化バリウム溶液を滴下し、pH メーターで pH をチェックしながら pH7.0 まで中和した。中和した溶液は遠心分離にかけ、上澄みを ADVANTEC No.131 ろ紙でろ過した。試料が残っている遠心管に蒸留水を適量加え、再び遠心分離にかけ、上澄みを ADVANTEC No.131 ろ紙でろ過した。各試料溶液に、25%アンモニア 0.25mL、水素化ホウ素ナトリウム 50mg、水 0.75mL を添加し一晩放置した。その後、酢酸（18M）0.1mL を添加し、過剰の水素化ホウ素ナトリウムを分解した。ナトリウムイオンを除去するため、イオン交換樹脂（TOYO PAK IC-SP M）に通過させ、ナス型フラスコに集めた。ロータリーエバポレーターにより、減圧乾固した。メタノール：酢酸（10：1）を添加し、ロータリーエバポレーターで減圧乾固する操作を2回繰り返した後、メタノールを加えて減圧乾固した。無水酢酸 2mL、1-メチルイミダゾール 0.2mL を加えて室温で1時間放置した。反応後、蒸留水 5 mL を加えて過剰の無水酢酸を分解した。ネジ栓付試験管に移し、ジクロロメタン 1 mL を加え、アセチル化糖をジクロロメタンに転溶した。2相に分かれたうちのジクロロメタン相である下層をネジ栓付試験管に移した。

この操作を 3 回繰り返した。硫酸ナトリウム (Na_2SO_4) を適量加え脱水し、一晩放置した。

その後キャップ付ガラス遠心管に移し、ロータリーエバポレーターで濃縮して、GC 分析に供試した。濃縮試料溶液の容量は 1mL とした。

キャピラリーガスクロマトグラフィーの条件

島津キャピラリーガスクロマトグラフ GC-14B を使用し、スプリットモードで試料を 2 μL インジェクトし測定を行った。GC カラムは、CP-Sil 43CB キャピラリーカラム (0.25 \times 25m) 内径 0.5mm、検出器は FID (水素炎イオン検出器) を使用した。オーブンの温度は 195°C から 225°C まで 4°C/min で昇温させ、225°C で 16 分保持し、インジェクター温度は 250°C、検出温度は 300°C で行った。

標準試料の測定

標準液は、表 1 に示した量が含まれるように混合した。これらの標準液から 100 μL をとり、サンプルと同様にホウ素化水素ナトリウム還元およびアセチル化して分析を行った。また、水素化ホウ素ナトリウムによる還元が安定に進行するように、標準液 3mL 中に 15M アンモニア水 200 μL を添加した。最終的なアンモニア濃度は 1 M になっている。

表 1. 糖標準液の組成 ($\mu\text{g}/3\text{mL}$)

	ミオイビトール	ヘキソース		ペントース		デオキシヘキソース		
		マンノース	ガラクトース	グルコース	アラビノース	キシロース	ラムノース	フコース
標準液1	500	250	250	250	125	125	125	125
標準液2	500	500	500	500	250	250	250	250
標準液3	500	1000	1000	1000	500	500	500	500

データ解析

得られたデータは、通常の集計およびグラフ化に加えて、JMP 統計ソフトを使用し、主成分分析、クラスター分析を行った。

2-8 赤外線吸収スペクトル

錠剤用 KBr 結晶（日本分光工業株式会社）1 粒（300～550mg）に対して、濃縮・精製した試料が 0.5%（1.5～2.75mg）になるよう計量し、めのう乳鉢上ですりつぶし、均一に混ぜ合わせた。バックグラウンド測定のために、KBr だけすりつぶしたのものも作った。混ぜ合わせた粉末は、管瓶に入れ真空デシケーターで乾燥させた。

KBr 錠剤形成器に、スパーテルで粉末試料を少量入れ、錠剤形成用簡易プレス上にセットし圧縮した。錠剤は、錠剤保持器に固定し、フーリエ変換赤外分光光度計（日本分光 FT/IR-400）で測定を行った。KBr のみの錠剤でバックグラウンド測定を行い、それから各試料錠剤の測定を行った。得られたスペクトルは、日本分光（Jasco）スペクトルマネージャによって解析した。

2-9 元素分析

真空乾燥機を用い、Molecularsieve4A 上で乾燥した試料を北海道大学機器分析センターに送り、炭素、窒素、水素、酸素、イオウおよび灰分含量の分析をして頂いた。

得られたデータは、通常の集計およびグラフ化に加えて、JMP 統計ソフトを使用し、主成分分析、クラスター分析を行った。

2-10 3次元蛍光スペクトル

濃縮・精製した試料（10mg）は、10m L の溶離液（0.033M ホウ酸リチウム

(イオン強度 0.1)) に溶かし、BIO-RAD Chelex 100 Resin 500mg で処理したのち 0.45 μ m メンブランフィルター (径 25mm) でろ過した。その試料を 0.5mL とり、0.1M リン酸 1 カリウム (イオン強度 0.1) 0.5mL を添加し、メスフラスコを用いて 0.033M ホウ酸リチウムと 0.1M リン酸 1 カリウムの等量混液で 50mL にメスアップした。この試料液の pH は 7.15 となった。また、5つの試料 (霧多布 2008 年 6 月、チライカリベツ 2008 年 6 月、紀文沼 2008 年 4 月、Lebang 2008 年 8 月、Bakong 2008 年 8 月) でゲル浸透クロマトグラフィーを行いフラクションに分けた。各フラクション 5mL に 0.1M リン酸 1 カリウム 5mL を添加した。測定溶液の pH は 7.15 である。

準備した試料溶液を 1cm \times 1cm の蛍光セルに入れ HORIBA JOBINYVON Fluoromax-4 Spectrofluorometer を使用し測定した。測定条件は、励起波長 240~550nm、5nm ごと、スリット幅 5nm、蛍光波長 290~600nm、2nm ごと、スリット幅 5nm で行った。

得られたデータは、北里大学真家永光講師に PRAFAC 解析をして頂いた。

2-10-1 蛍光インデックス

蛍光インデックスは、励起波長 370nm で、470nm の蛍光強度を 520nm の蛍光強度で割った値である。溶存有機物の由来の指標として、高い値は微生物由来の有機物の割合が高く、低い値は陸上の植物由来の有機物の割合が高いと考えられる (McKnight et al. 2001, Jaffé et al. 2008) 。

第3章 結果及び考察

3-1 pH・EC

表2にpH・ECの分析結果を示した。pHでは地域による大きな差はみられなかったが、ECにおいては、チライカリベツ試料が $100\mu\text{S}/\text{cm}$ を超える非常に高い値を示し、次に霧多布試料が高い値を示し、紀文沼試料とチライカリベツ試料は $50\sim 60\mu\text{S}/\text{cm}$ の値を示した。

3-2 全有機炭素 (TOC)

表3に全有機炭素の分析結果を示した。マレーシア試料のTOCは、 $40\sim 60\text{mg}/\text{L}$ の範囲を示し、北海道試料のTOCは、 $3\sim 16\text{mg}/\text{L}$ の範囲を示し、北海道試料よりマレーシア試料の方が非常に高かった。

マレーシア試料において、TOCは2007年12月(雨季)より2008年8月(乾季)が高かった。北海道試料において、TOCは2007年11月より2007年8月の方が高く、中でも紀文沼試料と霧多布試料は2008年8月のTOCが非常に高く、2007年11月のTOCと大きな差を示した。

表 2. pH、EC

試料	pH	EC(μ S/cm)
霧多布(2007.8)	—	—
霧多布(2007.11)	6.42	98.2
霧多布(2008.6)	6.26	83.7
チライカリベツ(2007.8)	7.08	137.4
チライカリベツ(2007.11)	7.65	155.5
チライカリベツ(2008.6)	6.41	114.8
チライカリベツ(2008.9)	6.25	121.2
紀文沼(2007.8)	6.73	63.7
紀文沼(2007.11)	7.33	61.9
紀文沼(2008.4)	5.4	50.3
紀文沼(2008.9)	5.91	52.3
沼川橋(2007.8)	6.58	48.4
沼川橋(2007.11)	7.32	62.9

表 3. TOC

試料	TOC(mg/L)
紀文沼(2007.8)	12.96
紀文沼(2007.11)	3.23
沼川橋(2007.8)	6.11
沼川橋(2007.11)	5.94
霧多布(2007.8)	15.58
霧多布(2007.11)	3.31
チライカリベツ(2007.8)	3.67
チライカリベツ(2007.11)	2.85
Lebang(2007.12)	40.22
Lebang(2008.8)	48.93
Bakong(2007.12)	42.85
Bakong(2008.8)	48.93

3-3 ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC)

図 3 に Toyopearl-HW65S カラムによる溶出曲線の一例として 2007 年 11・12 月試料の結果を示した。マレーシア試料は Bakong と Lebang のいずれも排除画分のないシャープな単一のピークを示した。このピークの溶出位置は、分子量 36500~39400 相当にした。北海道各地試料の溶出曲線は、一部の試料において排除画分が認められたが、大部分の試料で排除画分は認められず単一のピークを示した。これらの浸透画分のピーク溶出位置は、分子量 26900~36500 相当にした。

マレーシアにおいては、Lebang と Bakong の両地域とも、2008 年 8 月 (乾季) 試料より 2007 年 12 月 (雨季) 試料の方が大きなピークを示したが、その他の点で著しい違いが認められなかった (図 4)。

紀文沼の溶出曲線は、2007 年 8 月試料が 1 番広い分子サイズ分布を示し、浸透画分内にも他の試料と共通するメインピーク (分子量 26957 相当) と、非常に大きな分子量 (分子量 132268 相当) のピークをもっていた。さらに、わずかながら排除画分にも小さなピークが認められた。2007 年 11 月試料にも、排除画分のピークおよび浸透画分内の巨大分子サイズのピークがわずかにみられたが、2008 年 4 月、9 月試料ではなくなっており、シャープな浸透画分のメインピークがあるだけであった (図 5)。このように、季節によって溶存有機物の分子サイズに大きな変動が認められた。

これらのピークの実態については以下に示す各種分析の結果でも不明な点が多いが、非常に巨大な分子は、より小さな分子が集合したミセル状態の粒子である可能性がある。それは、これらの巨大分子画分を含む試料をサンプリングした際に、試料に鉄バクテリアによる濁りが認められ、鉄イオンが核となって有機物を凝集させていることが推定されたからである。

ただし、試料溶液は Chelex100 で処理したので、大部分の鉄イオンは試料溶

液から除去されていると考えられる。

また、後述する糖分析の結果において、紀文沼および沼川橋の試料は他の試料よりも糖含量が高かったことから、巨大な分子量をもつ多糖類がこれらの試料に含まれている可能性も考えられる。

霧多布の溶出曲線は、2007年8月試料の浸透画分内に巨大分子サイズに相当する肩状のピークがみられたが、2007年11月、2008年6月試料には浸透画分内に単一のシャープなピークになっていた(図6)。2007年8月試料にもサンプリング時に鉄バクテリアによる濁りが著しかった。

チライカリベツの溶出曲線は排除画分を持たず、浸透画分内に単一のシャープなピークを示し、季節変化がほとんどみられなかった(図7)。

沼川橋の溶出曲線は、2007年11月試料に浸透画分内のメインピークの他に、排除画分にピークを示し、巨大分子サイズ画分に肩状ピークがみられたが、2008年4月試料では、排除画分のピークや巨大分子サイズ画分の肩状ピークが消えて、単一ピークとなっていた(図8)。沼川橋の2007年11月試料においても、サンプリング時に濁りが認められた。

分析試料は全てキレックス 100 で処理して金属イオンを除去し、さらに 0.45 μm のメンブレンフィルターを通過させているものの、ミセル状態の分子の一部がメンブレンフィルターを通過し、巨大分子サイズ画分となったものと推定される。

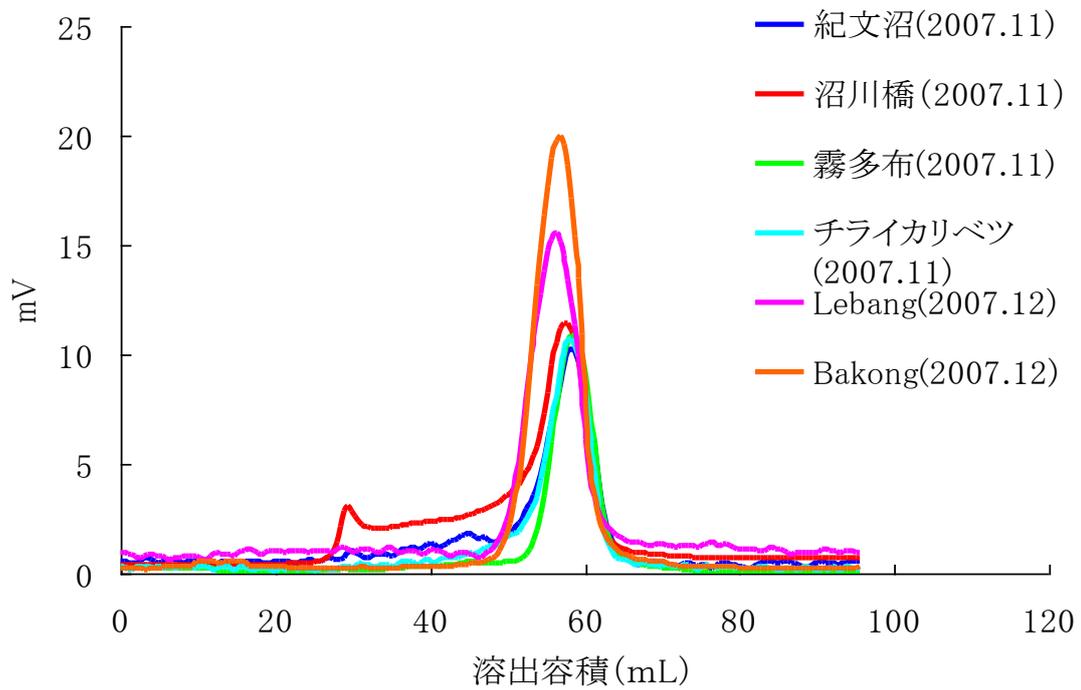


図 3. Toyoparl-HW65S カラム溶出曲線 一例

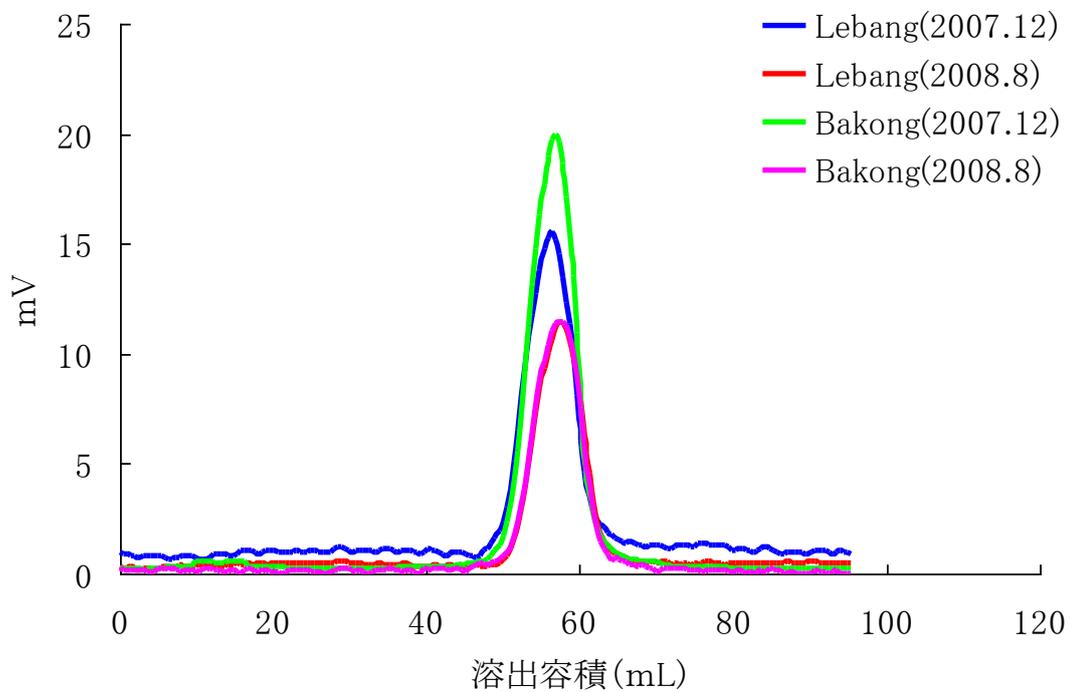


図 4. Toyoparl-HW65S カラム溶出曲線 マレーシア試料

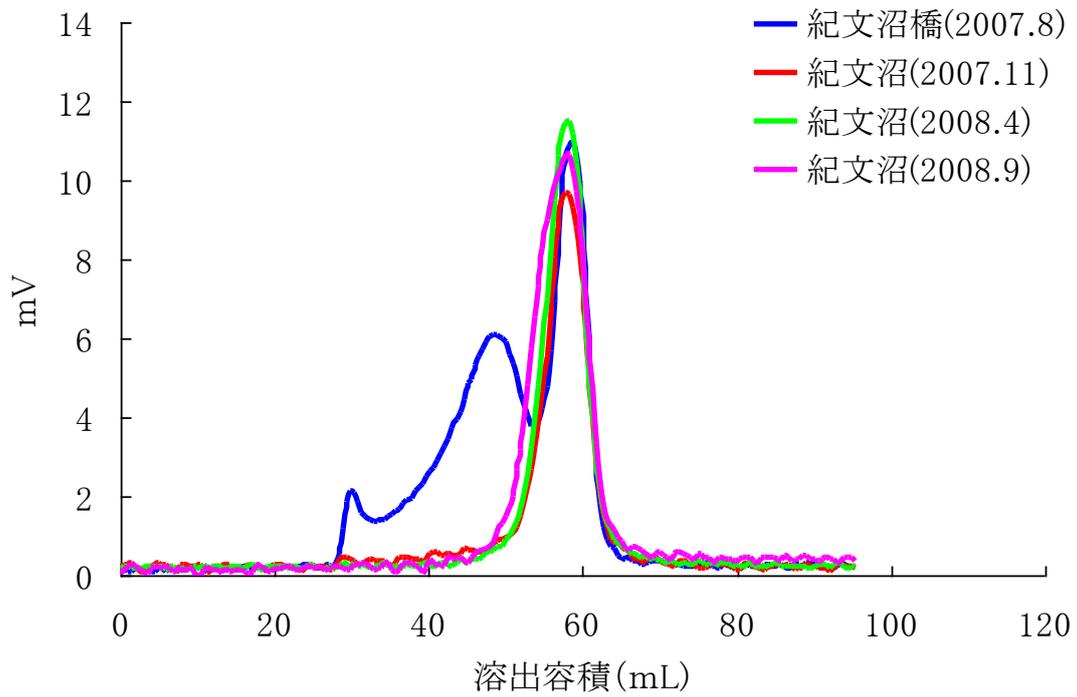


図 5. Toyopearl-HW65S カラム溶出曲線 紀文沼試料

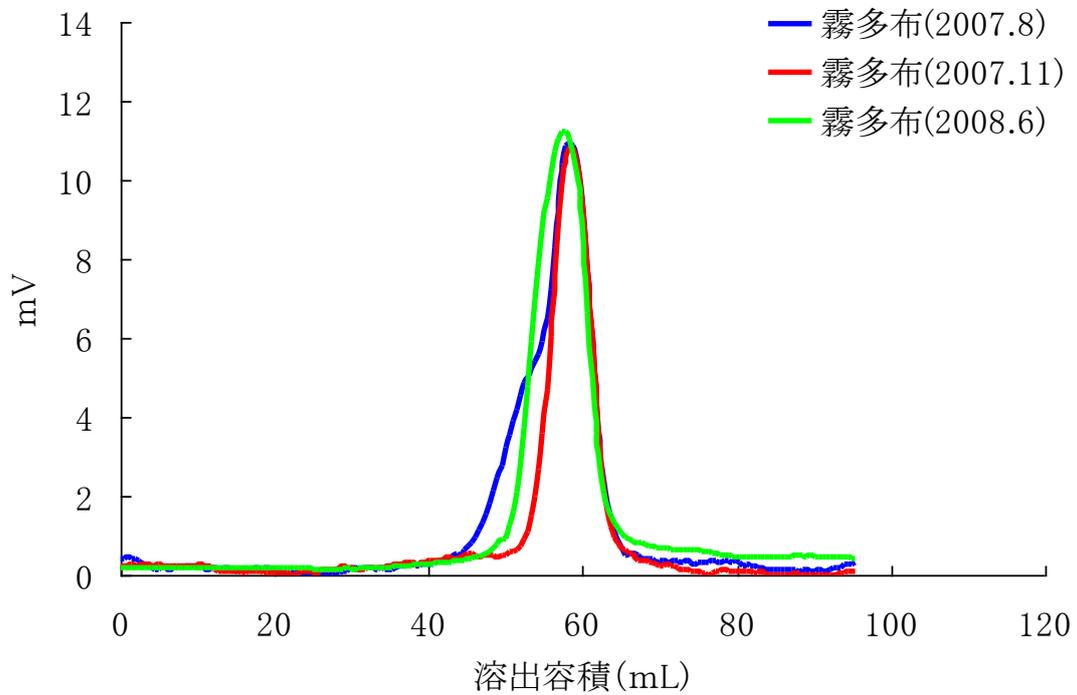


図 6. Toyopearl-HW65S カラム溶出曲線 霧多布試料

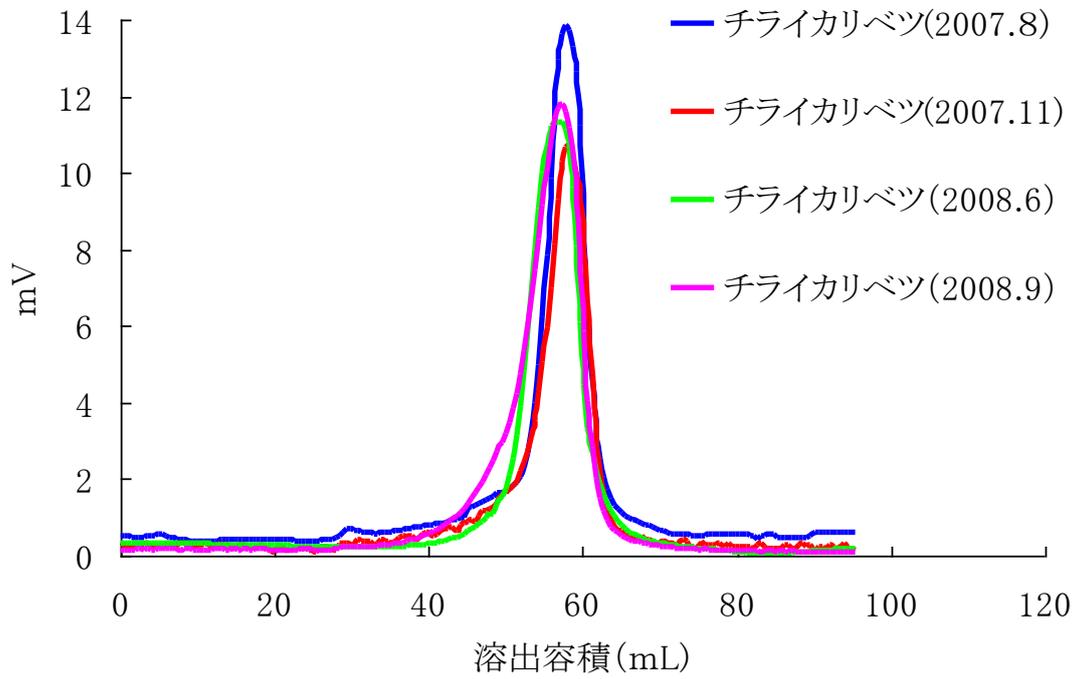


図 7. Toyopearl-HW65S カラム溶出曲線 チライカリベツ試料

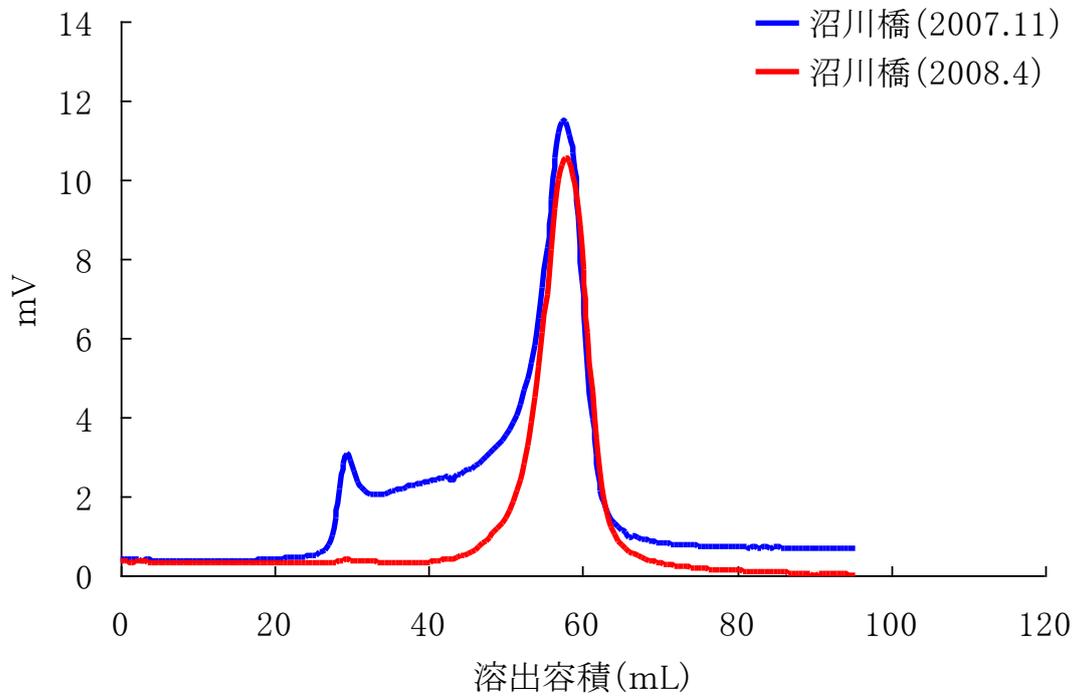


図 8. Toyopearl-HW65S カラム溶出曲線 沼川橋試料

図 9 に Toyopearl-HW50F カラムによる溶出曲線の一例として 2007 年 11・12 月試料の結果を示した。

Toyopearl-HW65S よりも分画分子量範囲が小さな Toyopearl-HW50F カラムを用いた場合も、マレーシア試料の溶出曲線はシャープな単一ピークを示した。浸透画分のピーク溶出位置は、分子量 23700～27900 に相当した。他方、北海道各地の試料の浸透画分のピーク溶出位置は、分子量 14900～20200 に相当し、その他に排除画分の位置にもピークがみられた。

紀文沼 2007 年 8 月試料と沼川橋 2007 年 11 月試料は、浸透画分のメインピークより排除画分のピークの方が高かった (図 10)。

マレーシア試料と北海道試料の溶出曲線を比較すると、マレーシア試料の方がシャープな分子サイズ分布を示し、ピークが高く、ピークの位置も高分子量よりであった。北海道試料においては、浸透画分のメインピークの溶出位置はマレーシア試料よりも低分子量側であったものの、他に排除画分の位置にピークがあり、高分子量側にも広がりが見られた。

3-3-1 分子量検量線

図 11 に分子量検量線を示した。

V_0 は、排除容量、 V_t は、総ベッド容量を示す。

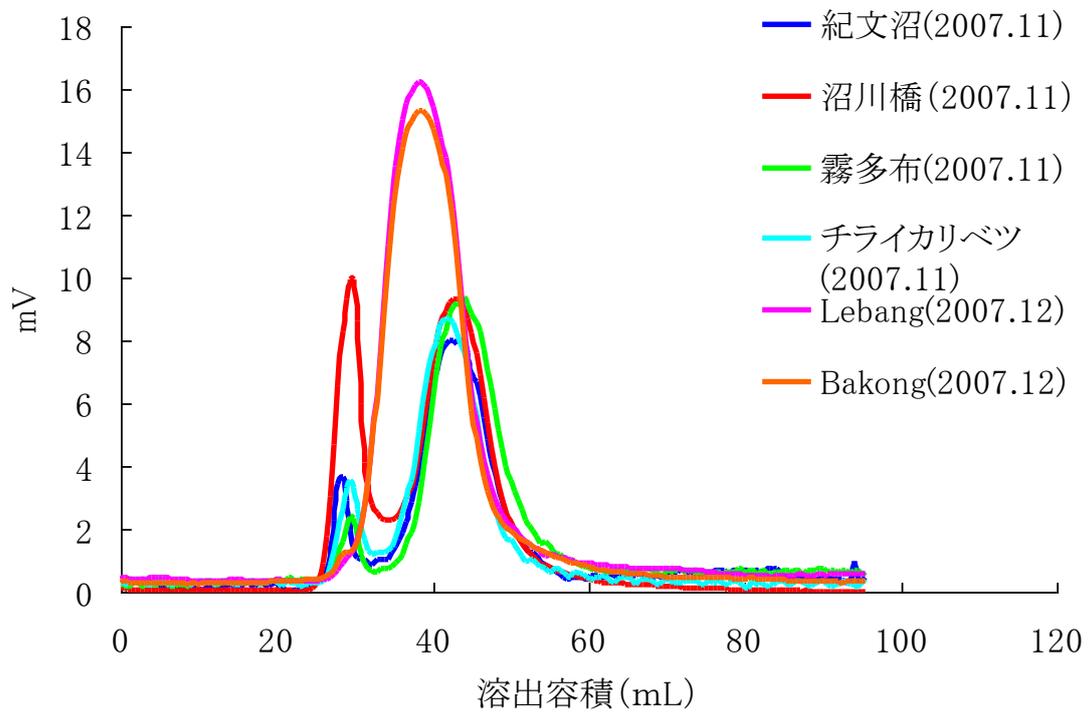


図 9. Toyoparl-HW50F カラム溶出曲線 一例

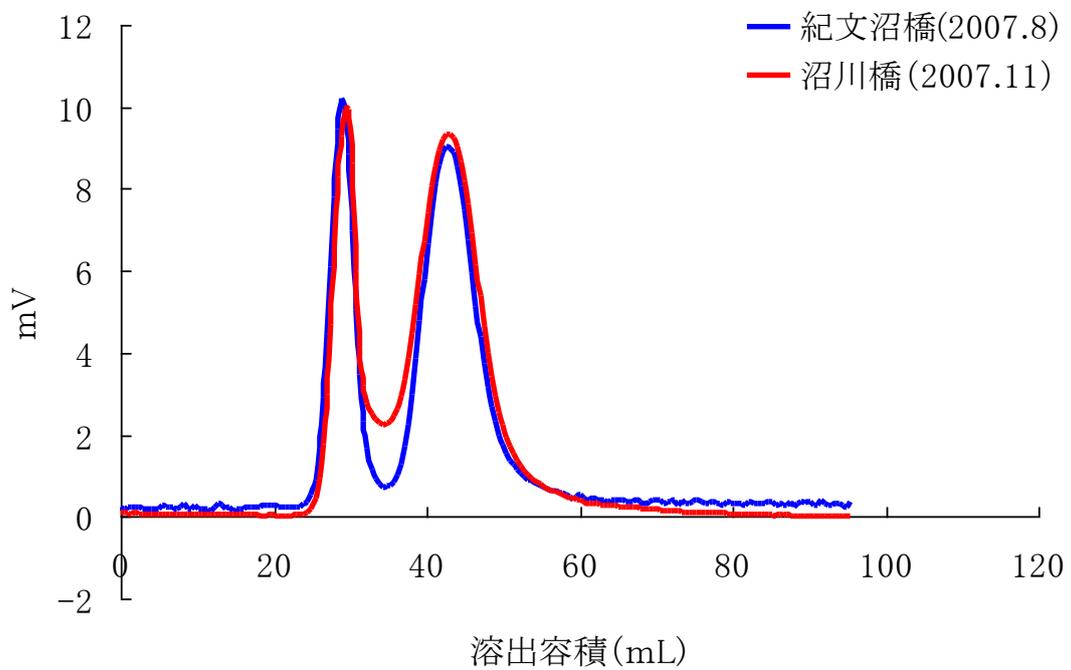


図 10. Toyoparl-HW50F カラム溶出曲線 紀文沼橋、沼川橋試料

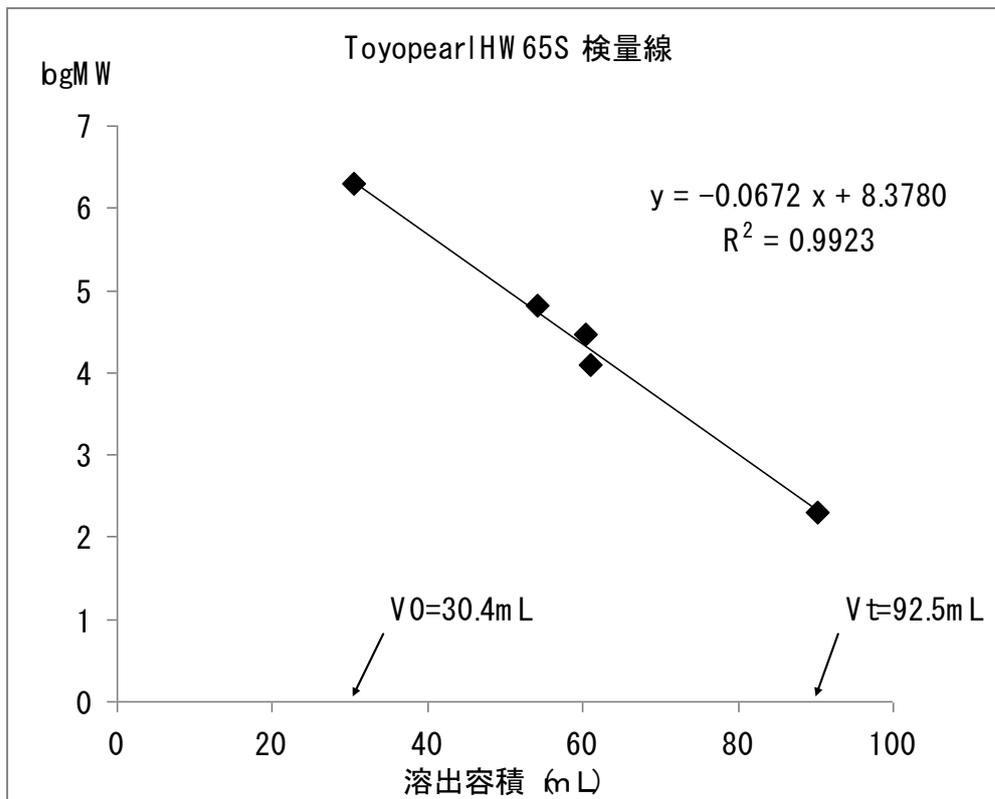


図 11-1. Toyoparl-HW65S カラム検量線

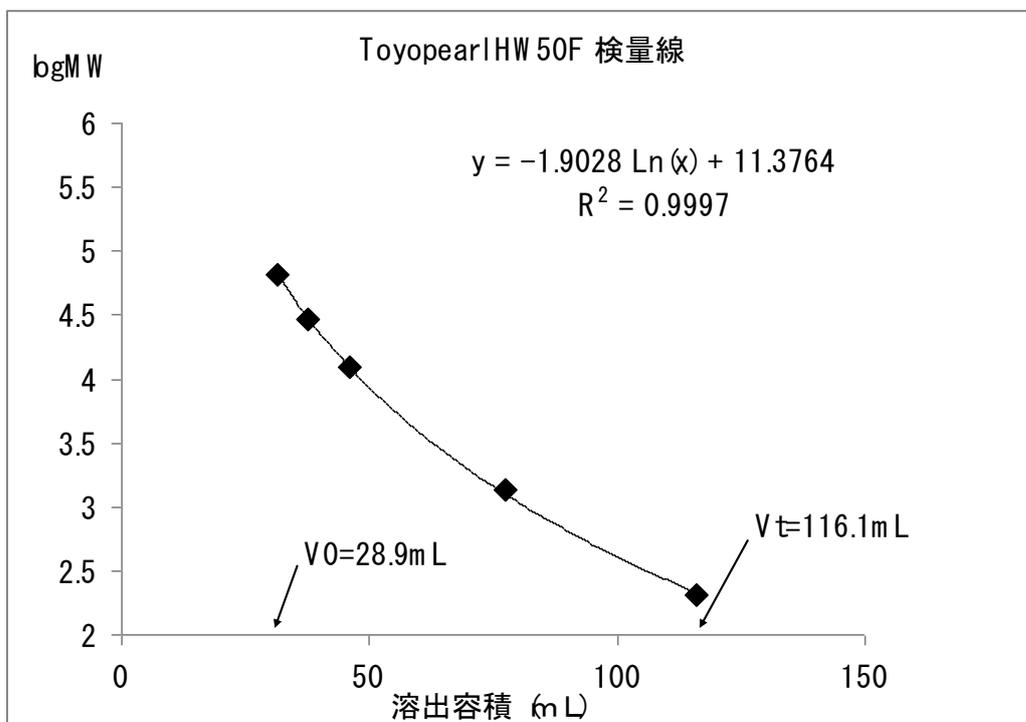


図 11-2. Toyoparl-HW50F カラム検量線

3-3-2 平均分子量

表 4 に Toyopearl HW65S カラムでの重量平均分子量 (M_n) と数平均分子量 (M_w)、多分散性 (M_w/M_n) の値を示した。

数平均分子量より重量平均分子量の方が大きい値を示し、紀文沼 2007 年 8 月試料と沼川橋 2007 年 11 月試料の値は他の試料と比べて、非常に高い値を示し、特に重量平均分子量において著しかった。

マレーシア試料においては、多分散性が 1.23 と低く、Toyopearl-HW65S カラムによる溶出曲線からも示されるように、分子量分布がシャープであった。

北海道試料の多分散性は、沼川橋 2007 年 11 月試料で 7.46 と最も高い値を示し、次に高かったのは紀文沼 2007 年 8 月試料の 4.96 で、どちらも Toyopearl-HW65S カラムによる溶出曲線で排除画分と巨大分子サイズ画分にピークをもっていた。他の北海道試料においては、1.26~2.52 の範囲に値を示した。このことから、マレーシア試料は多分散性が低く、北海道試料は多分散性が高く、マレーシア試料より北海道試料の方が、非常に巨大な分子から低分子まで多様な有機物を多く含んでいるとことが示された。

表 4. 平均分子量

	重量平均Mw	数平均Mn	多分散性Mw/Mn
紀文沼(2007.8)	251921	50800	4.96
紀文沼(2007.11)	61397	29917	2.05
紀文沼(2008.4)	39205	28581	1.37
紀文沼(2008.9)	37390	29793	1.26
沼川橋(2007.11)	337780	45284	7.46
沼川橋(2008.4)	46321	28804	1.61
霧多布(2007.8)	51716	30856	1.68
霧多布(2007.11)	36138	25302	1.43
霧多布(2008.6)	39742	28511	1.39
チライカリベツ(2007.8)	73875	29755	2.48
チライカリベツ(2007.11)	74729	29674	2.52
チライカリベツ(2008.6)	51877	32736	1.58
チライカリベツ(2008.9)	72234	37097	1.95
Lebang(2007.12)	45392	36865	1.23
Lebang(2008.8)	36876	29891	1.23
Bakong(2007.12)	42031	33952	1.24
Bakong(2008.8)	38256	31060	1.23

3-4 溶出液の分光分析および含有成分の吸光度法による分析

3-4-1 紫外・可視吸光度法による溶出曲線

溶存有機物には様々な種類の有機成分が含まれている。紫外・可視吸収は、二重結合をもつ多種類の有機物の検出方法として普遍的に用いられている。短波長の光ほど多くの化合物を検出し、他方、長波長側の光は共役二重結合系の発達した化合物を検出する。280nmの吸光度は、チロシンやトリプトファンによる吸収が大きいことからタンパク質の検出によく用いられている。他方、250nmあるいは254nmの吸光度は紫外部吸収をもつ化合物に対する一般的な検出波長として用いられている。

図12にToyopearl-HW50Fカラムで溶出した画分の250nm,280nmおよび400nmにおける溶出曲線の一例として紀文沼2007年8月試料を示した。

どの試料も250、280、400nmの吸光度のピークの傾向はよく似ていた。

400nm吸光度の250nm吸光度に対する比率により、長い共役二重結合系の発達程度（腐植化度のめやすのひとつ）を示すことができる。

図13にToyopearl-HW50Fカラムで溶出した画分のマレーシア試料における400nm/250nmの吸光度比の平均と北海道試料における400nm/250nmの吸光度比の平均の変化を示した。

マレーシア試料の400nm/250nm吸光度比は、0.18~0.23の値の範囲を示した。この比は、Bakong試料では溶出容積32mL付近で最大値を示し、徐々に値が減少していき、250nm吸光度による溶出曲線の北海道試料のピークにあたる約45mL付近の溶出容積で極小値（約0.18）となった。その後、400nm/250nm吸光度比は再び増大し、溶出容積50mL付近で高分子量画分と同様の0.2付近の値に戻った。測定したマレーシア試料の間であまり差はみられなかった。

このように、溶存有機物の腐植化度は、高分子量画分と比較的低分子量画分で高かったものの、マレーシア試料においては分子サイズの変化に伴う腐植化度の変動は少なかった。すなわち、マレーシア試料においては異なる分子サイズ画分間の均質性が高いと考えられる。

他方、北海道試料の 400nm/250nm 吸光度比は、0.08~0.21 の範囲で変動した。この比は、溶出容積約 35mL までは相対的に高い値で変動したが、この溶出容積を過ぎたところから急激に減少し、250nm 吸光度による溶出曲線のピークを過ぎた溶出容積約 48mL 付近で極小値に達した。その後、400nm/250nm 吸光度比は再び増大し、溶出容積 65mL 付近で高分子量画分と同様の 0.18 付近の値に戻った。

このように、北海道試料は分子サイズ画分によって腐植化度が大きく変化し、腐植化度の高い成分は、高分子量画分と低分子量画分に含まれ、ピークに相当する画分の腐植化度は低かった。

マレーシア試料と北海道試料を比較すると、マレーシア試料の方が高い腐植化度を示し、均質であった。北海道試料については、腐植化度が低く、しかも腐植化度の相対的に高い画分と相対的に低い画分が混在しており、不均一性が高かった。しかも、ピークに相当する画分の腐植化度が高いのではなく、高分子サイズ画分と低分子サイズ画分に高腐植化度の成分が含まれた。

高腐植化度の成分の溶出位置に関しては、マレーシア試料も北海道試料も共通しており、分子サイズから見る限りではマレーシアと北海道の間で高腐植化度の成分の類似性が認められた。

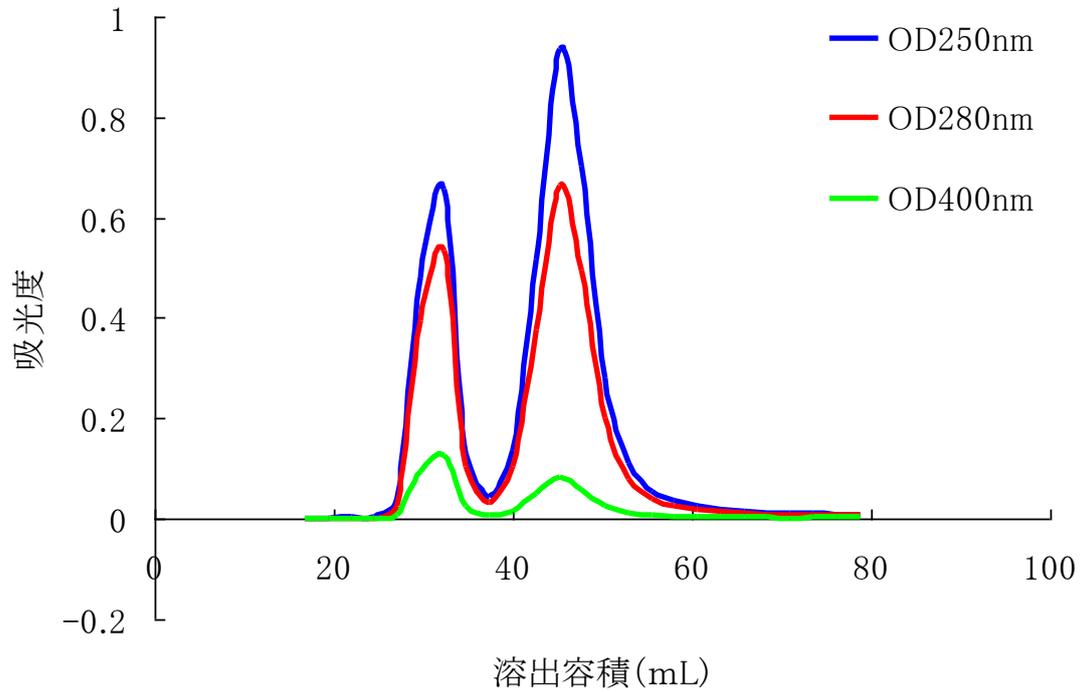


図 12. Toyopearl-HW50F カラム溶出画分の 250nm,280nm、400nm 溶出曲線 一例 (紀文沼 2007 年 8 月試料)

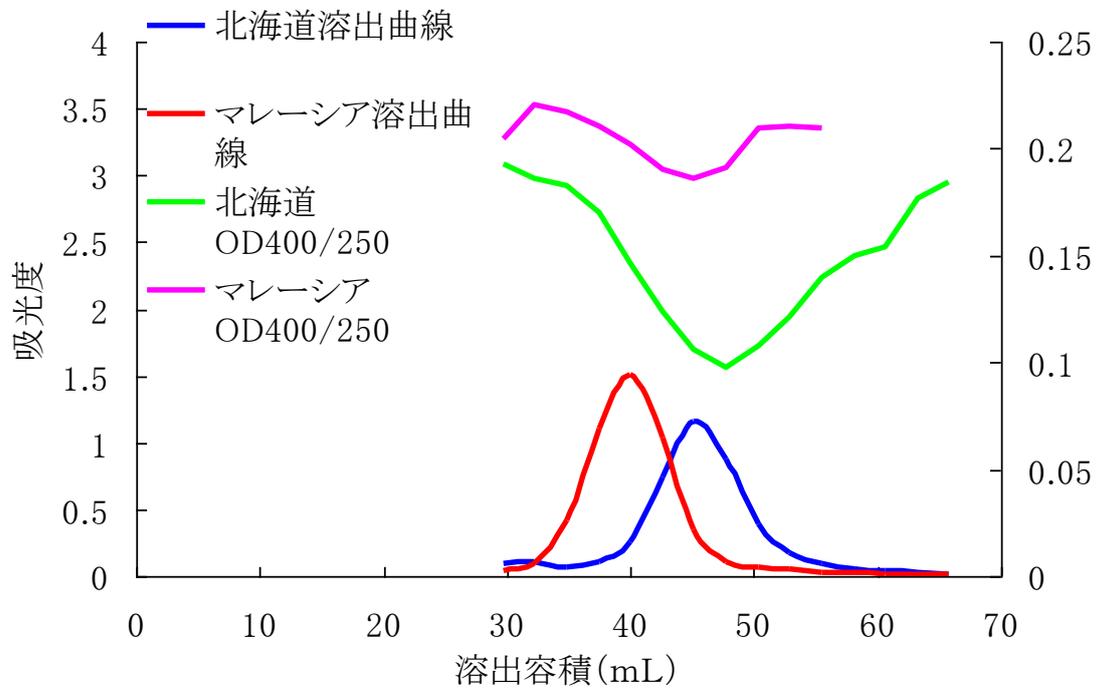


図 13. Toyopearl-HW50F カラム溶出画分 400nm/250nm の吸光度比

3-4-2 フェノール性化合物（フォリン法）の溶出曲線

Toyopearl-HW50F カラムを通過した画分について、フォリン法でフェノール性化合物含量を測定し、溶出曲線を作成した。検量線はフェノール標準溶液によって作成し、濃度はフェノール性炭素含量（mg/L）によってあらわした。

図 14 にフェノール性化合物溶出曲線の一例として 2007 年 11・12 月試料の結果を示した。フェノール性化合物は、250nm 吸光度による溶出曲線と同じ位置に最大ピークを示した。また、北海道試料よりマレーシア試料の方が高いフェノール性化合物濃度を示した。

マレーシア試料においては 250nm 吸光度での溶出曲線とは異なり、2007 年 12 月（雨季）試料と 2008 年 8 月試料（乾季）の差はあまりみられなかった。また、マレーシア相互間での差もほとんど認められなかった。

紀文沼試料は、250nm 吸光度の溶出曲線では 2007 年 8 月試料が最もピークが高く、排除画分も大きなピークを示していたが、フェノール性化合物の溶出曲線では、ピークの高さが相対的に低く、排除画分のピークも小さかった。紀文沼で 4 つの時期に採取した試料のなかでは、2008 年 9 月試料が最も高いピークを示した。

沼川橋試料のフェノール性化合物の溶出曲線は、250nm 吸光度での溶出曲線とは異なり、浸透画分のピークの高さが 2007 年 11 月試料より 2008 年 4 月試料の方が高くなった。排除画分のピークは、250nm 吸光度での溶出曲線では 2007 年 11 月試料にかなり大きな排除画分のピークが認められたのに対し、フェノール性化合物における排除画分のピークは、浸透画分のピークよりも非常に小さくなった。

霧多布試料のフェノール性化合物の溶出曲線は、2007 年 8 月・11 月試料ではほぼ同じ傾向を示し、2008 年 6 月試料のみ他の試料より非常に高いピ

ークを示した。

チライカリベツ試料のフェノール性化合物の溶出曲線は、2007年8月試料が他試料よりも若干シャープなピークであった以外は、ピークの傾向はどの試料も同じであった。ピークの高さは2008年6月>2008年9月>2007年11月=2007年8月の順に低くなっていった。

以上のように、フォリン法で測定したフェノール性化合物の溶出曲線は、250nm吸光度での溶出曲線における浸透画分と同じ位置にピークを示したものの、その分布のパターンは非常にシャープであり、また排除画分におけるフェノール性化合物の貢献は非常に小さかった。

このことから、フェノール性化合物は、湿原水溶存有機物の主要な構成成分の基本的な構造単位を構成していると考えられる。

3-4-3 タンパク質様物質 (Bradford 法) の溶出曲線

Toyopearl-HW50F カラムを通過した画分について、バイオ・ラッド プロテインアッセイ試薬を用いた Bradford 法で、タンパク質様物質含量を測定し、溶出曲線を測定した。検量線は、ウシ血清アルブミン (BSA) 溶液によって作成し、濃度はタンパク質様物質炭素含量 (mg/L) によってあらわした。ただし Bradford 法はタンパク質に対して鋭敏な発色を示すが、腐植物質のなかにも Bradford 試薬に対して反応する成分があるので、その解釈には注意が必要である。そのため、この論文では Bradford 法で得られた濃度を、タンパク質様物質濃度と表すことにした。

図 15 にタンパク質様物質の溶出曲線の一例として 2007 年 11・12 月試料の結果を示した。タンパク質様物質の溶出曲線は、250nm 吸光度による溶出曲線と浸透画分の主要なピーク的位置は共通していたが、ピークの幅の広さや、排除画分と浸透画分のバランス、複数の小さなピークの出現な

どの点で違いが認められた。また、北海道試料よりマレーシア試料の方が高いタンパク質様物質濃度を示した。

マレーシア試料のタンパク質様物質の溶出曲線は、250nm 吸光度による溶出曲線と同様に、浸透画分内に単一ピークを示し、その溶出容積も一致していた。また 2008 年 8 月（乾季）試料より 2007 年 12 月試料（雨季）の方が大きなピークを示した。

このように、250nm 吸光度による溶出曲線とタンパク質様物質の溶出曲線は同じ傾向を示し、その差はわずかであった。しかし、250nm 吸光度による溶出曲線ではみられなかった低分子量画分の複数の小さなピークがタンパク質様物質の溶出曲線ではみられた。

紀文沼試料のタンパク質様物質の溶出曲線は、浸透画分と排除画分のピーク以外にも、高分子量画分と低分子量画分の両方に重なり合った複数のピークを示した。その複数のピークの溶出位置から、2007 年 8 月試料と 2008 年 4 月試料間、また 2007 年 11 月試料と 2008 年 9 月試料間で類似性が認められた。2007 年 8 月試料と 2008 年 4 月試料のタンパク質様物質溶出曲線は、250nm 吸光度による溶出曲線と同じ位置に最大ピークを示したが、排除画分のピークや高分子量画分のピークも高く、相対的にブロードな溶出曲線を示した。2007 年 8 月試料は 250nm 吸光度による溶出曲線では最もピークが高かったが、タンパク質様物質の溶出曲線においては最も低いピークを示した。他方、2007 年 11 月試料と 2008 年 9 月試料のタンパク質様物質溶出曲線は、250nm 吸光度による溶出曲線よりやや高分子量画分の位置に最大ピークを示した。ピークの高さは、2008 年 9 月試料が最も高かった。

沼川橋試料のタンパク質様物質の溶出曲線においては、浸透画分に相当するピークの頂部が 2 つのピークに分離していた。この傾向は 2007 年 11

月試料と 2008 年 4 月試料の両方で認められたので、この地点の溶存有機物に特有の傾向であると考えられる。また、低分子量画分にも複数のピークがみられた。2007 年 11 月試料は 2008 年 4 月試料よりも大きなピークを示し、250nm 吸光度での溶出曲線における傾向と同様に、排除画分が同等の大きなピークを示した。

霧多布の 2007 年 8 月試料および 11 月試料のタンパク質様物質は、250nm 吸光度による溶出曲線と同じ溶出容積に排除画分と浸透画分のピークを示したが、その他にも低分子量画分に肩状ピークや複数の小さなピークも示した。他方、霧多布の 2008 年 6 月試料は上記 2 試料とは異なる傾向を示し、タンパク質様物質の溶出曲線は、沼川橋試料のタンパク質様物質の溶出曲線と同様に浸透画分の主要ピークの頂部が重なり合った 2 つのピークに分離した。2007 年 11 月試料においても浸透画分のピークに肩が認められたが、この肩は、2008 年 6 月試料の浸透画分における 2 つのピークのうち、最初に溶出するピークと対応していた。

チライカリベツ試料のタンパク質様物質の溶出曲線は、250nm 吸光度による溶出曲線よりやや高分子量画分に最大ピークを示し、低分子量画分にも肩状ピークや複数の小さなピークが存在した。ただ、チライカリベツ 2008 年 6 月試料のみ他の試料とは異なり、沼川橋試料や霧多布 2008 年 6 月試料にみられたように、浸透画分の主要ピークが 2 つのピークに分離した。ピークの高さは、2007 年 11 月試料が最も高く、2008 年 9 月、2008 年 6 月の順に低くなり、2007 年 8 月試料が最も低いピークを示した。

以上のように、Bradford 法で測定したタンパク質様物質の溶出曲線は、分布パターンが非常に多様であり、高分子量画分から低分子量画分にわたって様々なタンパク質様物質が含まれていると考えられる。浸透画分の主要ピークにも少なくとも 2 つの成分が貢献していた。また、排除画分におけ

るタンパク質様物質の貢献はフェノール性化合物よりも大きいことが示された。

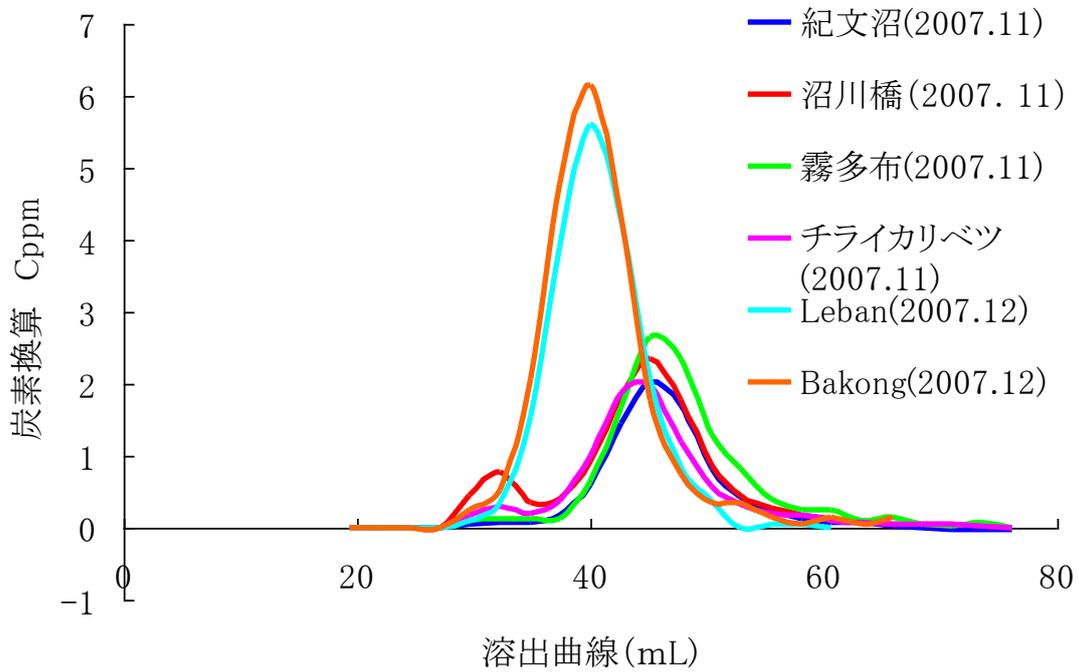


図 14. フェノール性化合物の溶出曲線 一例

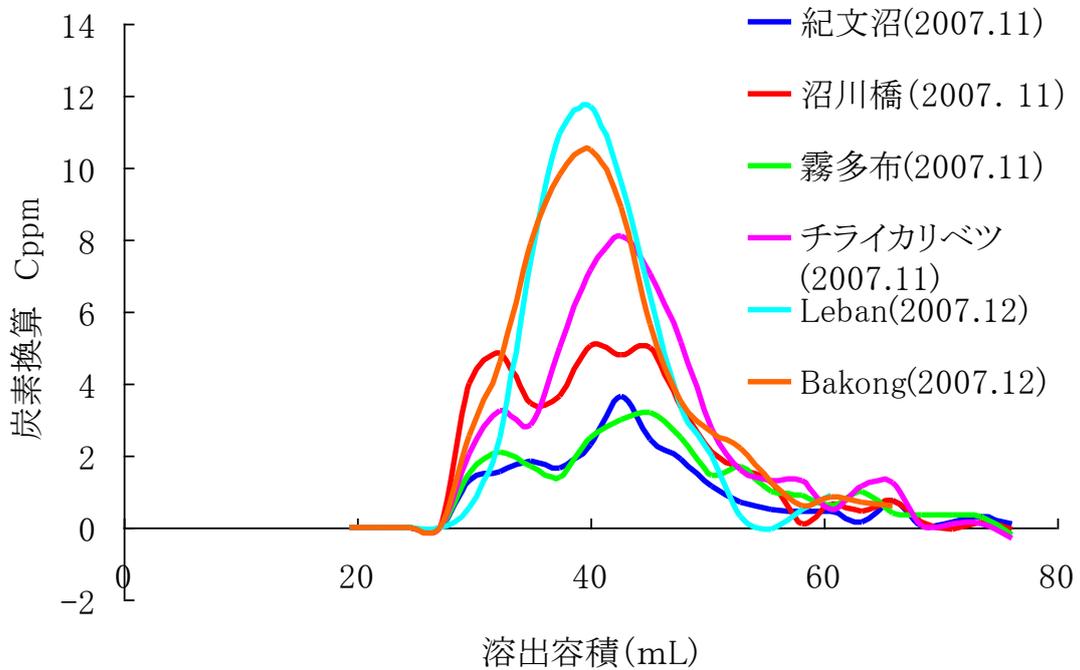


図 15. タンパク質様物質の溶出曲線 一例

3-4-4 糖（フェノール硫酸法・アンスロン法）の溶出曲線

Toyopearl-HW50F カラムを通過した画分について、フェノール硫酸法およびアンスロン法で糖含量を測定し、溶出曲線を作成した。検量線は、グルコースによって作成し、濃度は糖炭素含量(mg/L)によってあらわした。フェノール硫酸法は、糖一般の定量法として用いられ、アンスロン法は、ヘキソースの定量法として用いられている。

本研究で分析した湿原水溶存有機物においても、アンスロン法よりフェノール硫酸法の方が約 2 倍高い値を示した。これは、それぞれの方法で定量できる糖の種類が異なり、フェノール硫酸法ではヘキソース以外の糖も定量されるためと考えられる。

1) フェノール硫酸法

図 16 にフェノール硫酸法による糖溶出曲線の一例として 2007 年 11・12 月試料の結果を示した。

マレーシア試料の糖溶出曲線は、250nm 吸光度による溶出曲線と同じ位置に最大ピークを示した。排除画分は Bakong の 2008 年 8 月試料でわずかに認められたが、その他の試料には認められなかった。糖溶出曲線の浸透画分ピークは、2007 年 12 月（雨季）試料より 2008 年 8 月（乾季）試料の方が高いピークを示した。また、どちらの季節でも Lebang 試料より Bakong 試料の方がわずかな差ではあるが高いピークを示した。

北海道試料の糖溶出曲線は、250nm 吸光度による溶出曲線の浸透画分と同じ位置にピークを示したが、糖溶出曲線では排除画分のピークが相対的に高かった。また、浸透画分のピークよりも排除画分のピークの方が大きい場合がいくつかの試料でみられ、他方、低分子量画分にも小さなピークを示す試料があった。

紀文沼の糖溶出曲線では、2007年8月試料と2008年4月試料において、浸透画分より排除画分の方が大きなピークを示した。2007年8月試料は、250nm吸光度による溶出曲線でも排除画分のピークは大きかったが、2008年4月試料においては250nm吸光度による溶出曲線の排除画分のピークは非常に小さかったにもかかわらず、糖溶出曲線では排除画分の方が大きくなった。他方、2007年11月試料と2008年9月試料においては、排除画分より浸透画分の方が大きく、2008年9月試料が紀文沼4試料の中で最大のピークを示した。

沼川橋試料の糖溶出曲線は、浸透画分より排除画分の方が大きなピークを示した。特に、2007年11月試料においては、排除画分のピークが非常に大きく、全試料中でも排除画分の割合が最も大きかった。

霧多布試料の糖溶出曲線は、排除画分より浸透画分の方が大きなピークを示し、低分子量画分にも複数の小さなピークを示した。浸透画分のピークは、2008年6月試料が最も大きかったが、排除画分のピークは、2007年11月試料が最も大きかった。

チライカリベツ試料の糖溶出曲線は、250nm吸光度による溶出曲線よりも排除画分のピークの割合が大きく、低分子量画分にも複数の小さなピークが認められた。浸透画分のピークの高さは、2008年6月試料>2007年11月試料>2008年9月試料>2007年8月試料の順に低くなっていた。2008年6月試料のみ排除画分のピークが肩状ピークとなり、排除画分よりわずかに遅れて約35mL溶出位置に排除画分より大きなピークがみられた。

このように、フェノール硫酸法で測定した糖は、排除画分や高分子量画分における貢献がタンパク質様物質の貢献よりもさらに大きかった。フェノール硫酸法で測定した糖は、250nm吸光度による溶出曲線の浸透画分と同じ位置にもピークを示したが、これより低分子量画分にもいくつかの小さなピーク

クを示した。これらの小さなピークについては、溶出位置が溶存有機物の採取地点ごとに異なっており、また季節ごとにも異なる場合が多く認められた。

2) アンスロン法

アンスロン法は、グルコース、マンノース、ガラクトースのようなヘキソースに対しては高い感度を示すが、ペントースに対する感度は低い。一方、溶存有機物を加水分解したときに遊離するヘキソースのうち、グルコースの割合はほとんどの試料で最も高い。グルコースは、植物および微生物中のさまざまな多糖類に含まれているので、その由来を推定することは難しいが、難分解性のセルロースが溶存有機物中に含まれることはないので、比較的易分解性の成分に由来すると考えることができる。

図 17 にアンスロン法による糖溶出曲線の一例として 2007 年 11・12 月試料の結果を示した。

マレーシアの 2 カ所の試料においては、フェノール硫酸法によってもアンスロン法によっても、糖溶出曲線のピークは、2007 年 12 月（雨季）試料より 2008 年 8 月（乾季）試料の方が高いピークを示した。しかし、アンスロン法による糖の溶出曲線はフェノール硫酸法の溶出曲線とは異なり、どちらの季節でも Bakong 試料より Lebang 試料の方が高いピークを示した。このことは、Lebang 試料の方が易分解性の多糖類に富んでいることを示唆している。また、250nm 吸光度による溶出曲線ではみられなかった排除画分が、フェノール硫酸法と同様にアンスロン法によっても示されたが、アンスロン法の方が大きな排除画分を示した。

北海道試料のアンスロン法による糖溶出曲線は、250nm 吸光度による溶出曲線の浸透画分と同じ位置かやや高分子量画分にピークを示した。また、浸透画分のピークはより幅広くなり、さらに排除画分のピークの方が浸透画分

のピークより非常に大きかった。このことは、溶存有機物中には非常に高分子の多糖類が大きな割合で含まれていることを示している。反対に、250nmにおける浸透画分のピークが溶出し終わったあとの低分子量画分にも小さなピークを複数示す試料があった。しかしその溶出位置は試料によって異なっていた。このことは、低分子量の糖も溶存有機物中に含まれているが、その組成は地点ごとに異なっていることを示している。

北海道試料のアンスロン法による糖溶出曲線においては、一般に排除画分の方が浸透画分よりも大きくなるが多かったが、紀文沼試料は特殊な傾向を示した。すなわち、紀文沼試料のアンスロン法による糖溶出曲線では、2008年4月試料においてのみ、排除画分の方が浸透画分より約2倍高いピークを示した。2007年8月試料と2008年9月試料においては、浸透画分と排除画分のピークがはっきりと分離せず、ブロードな溶出曲線を示した。2007年11月試料においては、浸透画分と排除画分の間の40mL付近のピークが最も大きかった。2008年4月試料においては、250nm吸光度による溶出曲線の排除画分のピークは非常に小さかったにもかかわらず、アンスロン法による糖溶出曲線では排除画分の方が大きくなった。このことは、紫外部吸収をもたない多糖類成分が溶存有機物中に含まれていることを示す。

沼川橋試料のアンスロン法による糖溶出曲線は、いずれの採取時期においても浸透画分より排除画分の方が大きなピークを示した。特に、2007年11月試料においては、排除画分のピークが非常に大きく、浸透画分の約5倍高いピークを示した。ただ、浸透画分のピークは分離しておらず、ブロードなピークであった。紀文沼2008年4月試料の場合と同様に、沼川橋2008年4月試料は、250nm吸光度による溶出曲線の排除画分のピークが非常に小さかったにもかかわらず、アンスロン法による糖溶出曲線では排除画分の方が大きくなった。

霧多布およびチライカリベツ試料のアンスロン法による糖溶出曲線においても、排除画分が大きな割合を占めていたが、これらの試料においては、浸透画分も排除画分と同様に大きな割合を示すことが特徴であった。

ほとんどの試料の 250nm 吸光度による溶出曲線では浸透画分がメインピークであったが、これは、多糖類の中にもメインピークと同じ分子サイズ分布を示すものがあることを示している。アンスロン法による糖溶出曲線の浸透画分が排除画分よりも大きかったのは、霧多布においてもチライカリベツにおいても 2007 年 8 月と 2008 年 6 月の試料であり、より暖かい季節に浸透画分の糖ピークが多くなる傾向が認められた。

霧多布試料のアンスロン法による糖溶出曲線は、2008 年 6 月試料において、排除画分より浸透画分の方が大きなピークを示し、浸透画分のピークは非常にシャープであった。2007 年 8 月試料と 2007 年 11 月試料のアンスロン法による糖溶出曲線は、250nm 吸光度による溶出曲線よりも排除画分の割合が大きく、特に 2007 年 11 月試料においては、浸透画分より排除画分のピークの方が大きかった。他方、霧多布 3 試料とも低分子量画分にも小さなピークがみられた。

チライカリベツのアンスロン法による糖溶出曲線は、250nm 吸光度による溶出曲線よりも排除画分の割合が大きく、低分子量画分にも複数の小さなピークが認められた。排除画分のピークの高さは、2008 年 9 月試料 > 2007 年 11 月試料 > 2008 年 6 月試料 > 2007 年 8 月試料の順に低くなっていった。浸透画分のピークは、2008 年 6 月試料が 1 番大きく、他の 3 試料に違いはななく同じ大きさだった。

このように、アンスロン法で測定した糖は、排除画分や高分子量画分における貢献の程度がタンパク質様物質の貢献よりもさらに大きかった。アンスロン法で測定した糖は、250nm 吸光度による溶出曲線の浸透画分と同じ位置

にもピークを示したが、これより低分子量画分にもいくつかの小さなピークを示した。これらの小さなピークについては、溶出位置が溶存有機物の採取地点ごとに異なっており、また季節ごとにも異なる場合が多く認められた。

これらのことから、アンスロンで発色する糖には、非常に高分子の紫外部吸収を持たない多糖類、紫外部吸収を持つ腐植物質成分と挙動を同じくする多糖類、および紫外部吸収を持たず分子量も小さな多糖類などが含まれ、非常に多様な組成を持つことが示唆された。

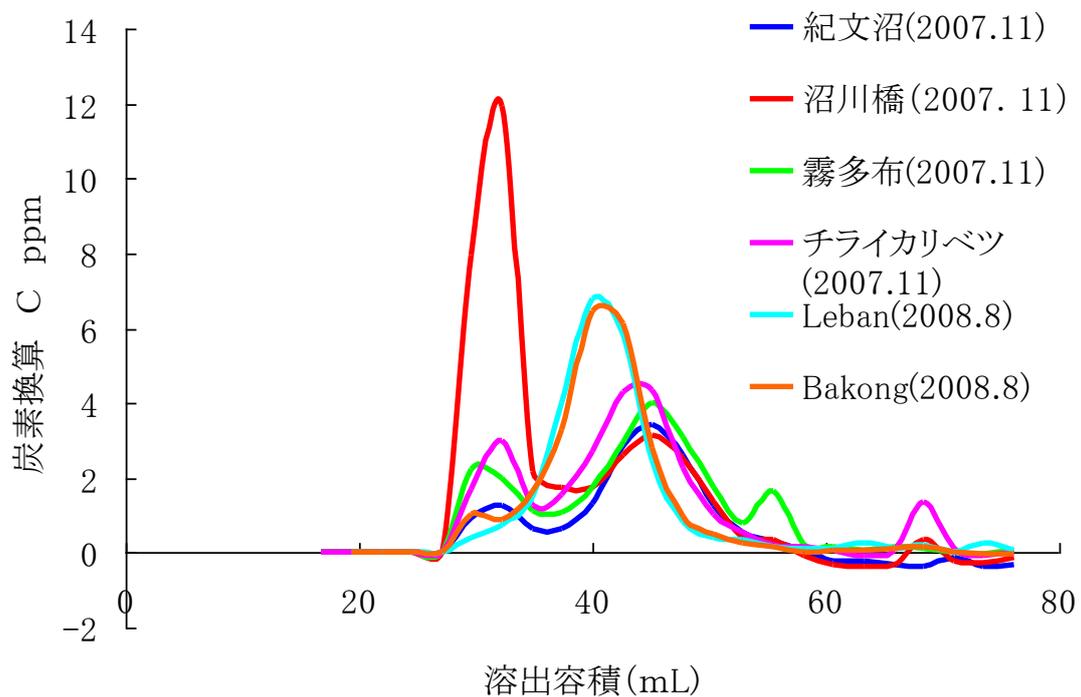


図 16. フェノール硫酸法による糖溶出曲線 一例

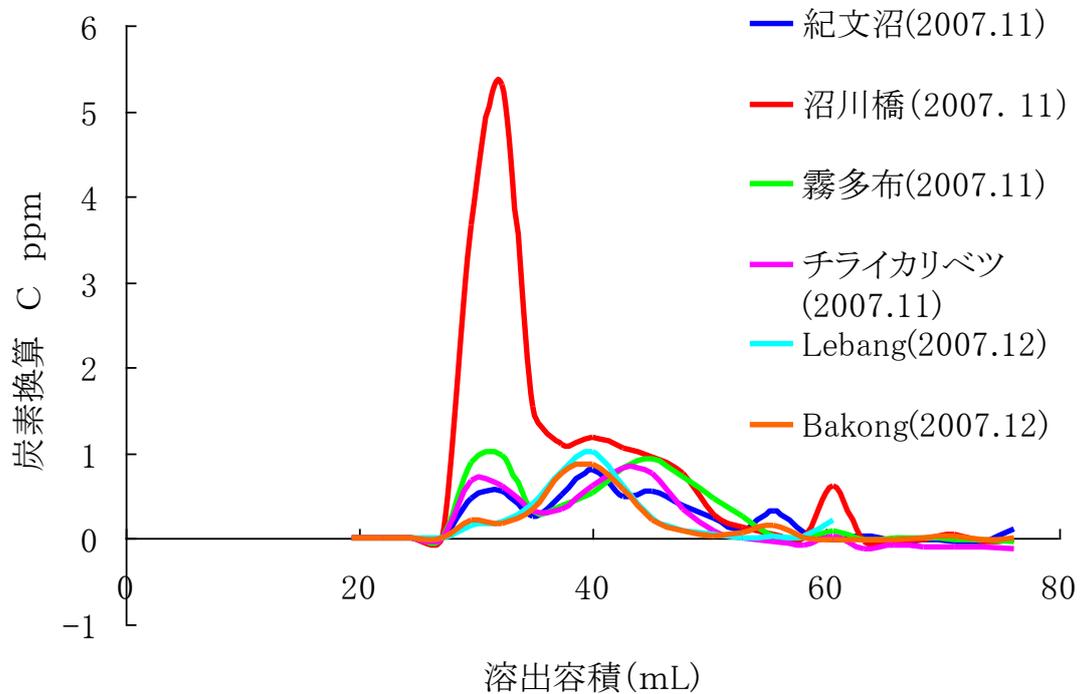


図 17. アンスロン法による糖溶出曲線 一例

3-4-5 有機炭素（立川法）の溶出曲線

Toyopearl-HW50F カラムを通過した画分について、立川法で有機炭素含量を測定し、溶出曲線を作成した。検量線は、グルコースによって作成し、濃度は有機炭素含量(mg/L)によってあらわした。立川法は有機炭素に対する感度は低かったが、発色は非常に安定で再現性が高かった。

図 18 に有機炭素溶出曲線の一例として 2007 年 11・12 月試料の結果を示した。有機炭素は、250nm 吸光度による溶出曲線と同じ位置に最大ピークを示した。また、ピークにおいては、北海道試料よりマレーシア試料の方が高い有機炭素濃度を示した。

マレーシア試料の有機炭素溶出曲線は、250nm 吸光度による溶出曲線と同じ位置に最大ピークを示した。排除画分は、Lebang2007 年 12 月試料でわずかに認められたが、その他の試料には認められなかった。

紀文沼試料の 250nm 吸光度の溶出曲線では 2007 年 8 月試料が最もピークが高く、排除画分も大きなピークを示していたが、有機炭素の溶出曲線では、ピークの高さが相対的に低く、排除画分のピークも小さかった。紀文沼で 4 つの時期に採取した試料のなかでは、2008 年 9 月試料が最も高いピークを示した。紀文沼 2007 年 8 月試料の排除画分ピークは、Toyopearl HW65S カラムでの溶出曲線の結果からも非常に高分子量の画分であることが示されていたが、この画分は強い紫外部吸収の割には有機炭素濃度が低いことが明らかとなった。

強い紫外部吸収をもたらす化学構造としては、発達した共役二重結合系の他にも金属との錯体などもその要因として考えられる。この画分は何らかの要因によって強い紫外部吸収を持っていたが、その原因について解明する必要がある。

沼川橋の試料は、その他の試料と比較して、排除画分の有機炭素濃度が

最も高かった。このことは、この地点においては高分子量の溶存有機物が多く含まれていることを示している。沼川橋 2008 年 4 月試料においては、排除画分の有機炭素濃度が高いにも関わらず 250nm の吸光度は低かったことから、排除画分には紫外部吸収の少ない成分（多糖類など）の貢献が大きいと考えられた。沼川橋 2007 年 11 月試料においては、2008 年 4 月試料よりもさらに排除画分の割合が高かった。2007 年 11 月試料は、排除画分におけるフェノール性成分、タンパク質様物質、多糖類成分の貢献も大きかったことから、沼川橋の溶存有機物中には、腐植物質以外の非腐植物質成分の貢献が大きいと考えられた。

霧多布試料の有機炭素の溶出曲線は、2007 年 8 月・11 月試料ではほぼ同じ傾向を示し、2008 年 6 月試料のみ他の試料より高いピークを示した。

チライカリベツ試料の有機炭素の溶出曲線は、2007 年 11 月試料が他試料よりもピークが低かった以外は、ピークの傾向はどの試料も同じであった。

このように、立川法で測定した有機炭素の溶出曲線は、フェノール性化合物の溶出曲線の傾向とよく似て、分布のパターンがシャープで、また、排除画分における有機炭素の貢献は非常に小さかった。

立川法で測定した有機炭素の溶出曲線は、溶存有機物中の全有機物の濃度を反映すると考えられる。その溶出曲線は 250nm 吸光度による溶出曲線およびフェノール性化合物による溶出曲線とよく似たパターンを示したが、糖およびタンパク質様物質の溶出曲線とはかなり異なっていた。これは、溶存有機物中では腐植物質やフェノール性化合物の量的な貢献が大きく、糖およびタンパク質様物質の量的貢献は少ないことを反映したものである。

図 18 では、溶存有機物中の各成分の溶出曲線を炭素 mg/mL の単位で比較し、また、各成分の全有機炭素に対する割合を計算した（表 5）。

立川法で測定した有機炭素濃度に含まれるフェノール性化合物、タンパク質様物質、多糖類成分の割合は、マレーシア試料においては、タンパク質様物質が一番高く約 24%を占め、次にフェノール性化合物と多糖類成分が約 14%を占めていた。

北海道試料においては、紀文沼試料のみ多糖類成分が一番高く約 14%を占めていたが、他の霧多布試料、沼川橋試料、チライカリベツ試料においてはタンパク質様物質が一番高く約 18%を占めていた。

マレーシア試料と北海道試料を比較すると、マレーシア試料の方がタンパク質様物質とフェノール性化合物の占める割合が大きかった。一方、北海道試料はマレーシア試料より多糖類成分が占める割合が大きかった。

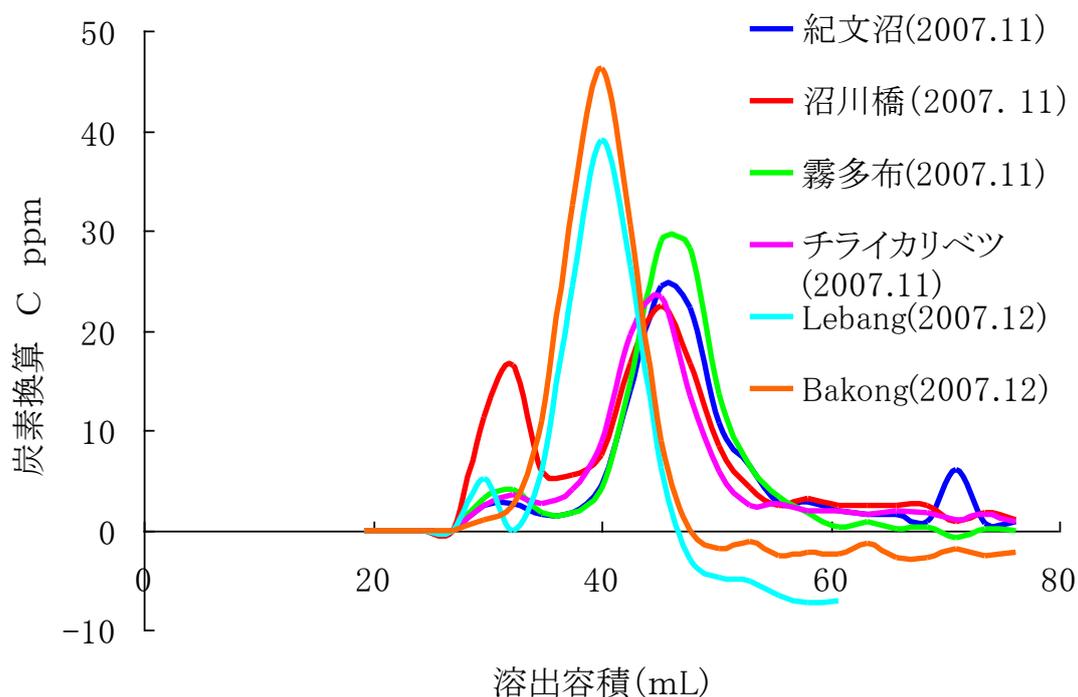


図 18. 有機炭素の溶出曲線 一例

表 5. 各成分の全有機炭素に対する割合

	フェノール 性化合物	タンパク質 様物質	フェノール 硫酸法に よる糖	アンスロン 法による 糖
紀文沼(2007.8)	5.7	7.7	9.4	1.4
紀文沼(2007.11)	8.3	14.9	14.1	2.3
紀文沼(2008.4)	8.4	10.3	16.0	3.2
紀文沼(2008.9)	8.5	15.3	14.5	2.0
沼川橋(2007.11)	10.5	22.3	14.0	4.3
沼川橋(2008.4)	10.1	14.7	16.8	6.8
霧多布(2007.8)	9.3	22.3	11.4	3.4
霧多布(2007.11)	9.2	11.0	14.0	3.2
霧多布(2008.6)	11.5	13.8	13.7	4.7
チライカリベツ(2007.8)	6.0	9.8	8.0	2.4
チライカリベツ(2007.11)	8.5	34.7	18.6	3.5
チライカリベツ(2008.6)	8.7	14.7	14.0	3.0
チライカリベツ(2008.9)	7.8	17.7	10.9	2.4
Leban(2007.12)	14.3	29.9	13.0	2.6
Leban(2008.8)	12.5	19.9	13.7	2.9
Bakong(2007.12)	13.3	22.7	11.9	1.9
Bakong(2008.8)	13.8	24.5	20.7	3.4

3-5 糖組成分析

表 6 にキャピラリーガスクロによって定量した糖組成の結果を示した。マレーシア試料より北海道各地の試料の方が、各構成糖の収量合計値が高かった。

マレーシア試料では、2007 年 12 月（雨季）試料より 2008 年 8 月（乾季）試料の方が高い収量を示した。また、Lebang 試料より Bakong 試料の方がどちらの季節でも高い収量を示した。この傾向は、フェノール硫酸法の糖溶出曲線とも一致した。このように、マレーシア内では季節による違いと、地域による違いが明らかになった。糖成分は、腐植物質よりも不安定であり、湿原における有機物の分解や動態においては初期の段階に位置づけられる有機物であると考えられる。

Bakong はオイルパームプランテーションを開くために、湿地林が伐採されて間もない地点であり、伐採された木材や、地表に露出した泥炭が活発に分解を受けている地点である。このため、溶存有機物中の糖含量も高くなったものと考えられる。また、雨季と乾季の違いについては、日射量や乾燥度合いの影響で、乾季の方が有機物の分解が速く、そのため糖含量の増大に結びついたものと考えられる。

北海道各地の試料でガスクロによる糖の収量を比較すると、沼川橋試料が一番高い糖含量を示した。中でも、沼川橋試料の 2007 年 11 月試料が特に高い値を示した。

紀文沼試料のガスクロによる糖含量は、2007 年 8 月試料が最も低く、2008 年 4 月試料、2007 年 11 月試料、2008 年 9 月試料の順に減少した。この傾向は、フェノール硫酸法の糖溶出曲線において 2008 年 4 月試料の排除画分が最も高いピークを示したことも一致した。すなわち、紀文沼試料では、夏の暑い時期（8・9 月）に糖含量が低く、春や秋の寒い時期（11・4 月）に糖含量が高いという傾向を示した。

霧多布試料のガスクロによる糖含量は、2008年6月試料より2007年11月試料が高い値を示した。この傾向は、フェノール硫酸法の糖溶出曲線において2008年6月試料より2007年11月試料の排除画分のピークが高かったこととも一致した。

チライカリベツ試料のガスクロによる糖含量は、2007年8月試料が最も低く、2007年11月試料、2008年6月試料、2008年9月試料の順に減少した。この傾向は、フェノール硫酸法の糖溶出曲線における排除画分のピークの高さの関係とも一致した。チライカリベツ試料でも紀文沼試料と同様に、夏の暑い時期（8・9月）に糖含量が低く、春や秋の寒い時期（6・11月）に糖含量が高いという傾向を示した。このことから、北海道各地の試料では、寒い時期（特に11月）に糖含量は高く、暑い時期（特に8月）に糖含量が低くなるということが示され、季節変化が明らかになった。気温の高い時期には、有機物の生成と同時に分解も盛んなので、そのバランスとして、北海道の試料では夏季に溶存有機物の糖含量が減少したものと考えられる。

各糖の存在比（Mol%）においては、北海道試料よりマレーシア試料の方が、ラムノース、アラビノース、マンノース、ガラクトースの割合が高いことを示した。これらの糖は微生物に由来する割合が大きいと考えられている（村山，1987）。

また、各湿原水溶存有機物の糖組成についても比較を行った。マンノースは主として微生物起源の糖質、キシロースは主として植物起源の糖質と考えられていることから、マンノース／キシロースの比率を求め、各試料で比較した。マレーシア試料のマンノース／キシロースの比率（ 0.76 ± 0.06 ）は、北海道各地の試料（ 0.45 ± 0.16 ）より値が高かった。従ってマレーシア試料の糖質は微生物由来の割合が高いと考えられる。これは熱帯における活発な有機物分解を反映したものであろう。北海道試料でマンノース／キシロースの比率が低かったの

は、草本植物の主要な構成多糖類であるヘミセルロースが分解を受けて、キシロースやアラビノースなどのペントースを多く含む多糖類が遊離し、これが DOM 中に貢献しているためと考えられる。ただし、マレーシア試料においてマンノース/キシロース比率が高かったことは、マレーシアでヘミセルロースの分解およびペントース多糖類の生成が少なかったことを意味するのではなく、キシロースやアラビノースなどのペントースは非常に分解を受けやすい糖なので、マレーシアのように気候が温暖な条件のもでは急速に分解を受け、その結果、マンノース/キシロースの比率が高くなったと考えられる。

表 7 に糖収量 Mol% の主成分分析の結果を示した。

第 1 主成分においては、アラビノースとキシロースの固有ベクトルの貢献が大きく、反対にグルコースの固有ベクトルはマイナスの貢献をした。このことから、第 1 主成分に対しては植物のヘミセルロース由来の糖の貢献が大きいと考えることができる。第 1 主成分の寄与率は、37.3%であった。第 1 主成分ベクトルは、チライカリベツ 2008 年 6 月試料<紀文沼 2007 年 8 月試料<霧多布 2008 年 6 月試料<紀文沼 2008 年 9 月試料の順に増大した。このことは、北海道の暖かい季節にヘミセルロースが分解されてアラビノースとキシロースが生成するが、冷涼な気候条件下では長い時間溶存有機物中に滞留することを反映したものと考えられる。

第 2 主成分においては、マンノースおよびガラクトースの固有ベクトルの貢献が大きく、その寄与率は 31.5%であった。第 2 主成分ベクトルは、マレーシアの DOM 試料において高い値を示した。北海道試料においては、沼川橋 2007 年 11 月試料のみプラスの値で、他の試料はマイナスの値を示した。このことは、マレーシアの DOM の多糖類中には微生物由来の糖の貢献が大きいことを意味し、熱帯で活発な有機物分解の進行を反映して、微生物由来の糖が多く生成することを示している。

第3主成分においては、フコースの固有ベクトルの貢献が0.77と非常に大きかった。同じデオキシヘキソースに属するラムノースの固有ベクトルは、-0.41とマイナスの貢献を示した。第3主成分の寄与率は18.7%であった。第3主成分ベクトルは、沼川橋および紀文沼の試料で高い傾向を示し、沼川橋2008年4月試料<紀文沼2007年8月試料<沼川橋2007年11月試料の順に高くなった。フコースは、植物、藻類、微生物など多様な給源を持つため、その由来について特定することは困難であるが、紀文沼と沼川橋は同じ水系であるため、地域的な植生・地質・水質などが糖組成に影響を及ぼしたものと考えられる。また、先にも述べたように沼川橋および紀文沼では溶存有機物中の糖含量の割合が、他の地点と比べて高いという特徴があった。

表 6. 糖組成

	上段:収量(mg g ⁻¹) 下段:存在(Mol%)							Total	Man/Xyl
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc		
Lebang0712	1.01	0.40	0.97	1.20	0.88	1.27	1.42	7.15	0.73
	14.35	5.72	15.06	18.66	11.38	16.43	18.40		
Lebang0808	1.24	0.38	0.76	1.05	0.89	1.36	1.56	7.23	0.84
	17.52	5.34	11.75	16.29	11.47	17.49	20.15		
Bakong0712	1.38	0.62	1.02	1.44	1.12	1.81	2.16	9.55	0.78
	14.79	6.68	11.96	16.89	10.92	17.69	21.06		
Bakong0808	1.66	0.94	1.19	2.05	1.45	2.66	2.64	12.59	0.71
	13.48	7.66	10.59	18.24	10.76	19.72	19.56		
霧多布0711	8.03	5.53	5.30	9.41	4.20	7.97	19.40	59.84	0.45
	13.75	9.47	9.92	17.61	6.55	12.43	30.27		
霧多布0806	3.60	2.31	3.71	6.24	1.61	4.19	4.37	26.03	0.26
	13.84	8.87	15.58	26.18	5.62	14.64	15.28		
チライカリベツ0708	2.12	1.52	1.93	2.58	1.43	2.25	11.44	23.27	0.55
	9.47	6.80	9.46	12.63	5.81	9.19	46.65		
チライカリベツ0711	6.80	4.16	4.66	7.94	3.70	9.62	14.15	51.03	0.47
	13.67	8.35	10.23	17.44	6.77	17.62	25.91		
チライカリベツ0806	4.33	2.98	3.73	5.16	2.28	4.32	5.86	28.66	0.44
	15.27	10.49	14.38	19.88	7.32	13.85	18.81		
チライカリベツ0809	3.21	2.01	3.10	4.08	1.90	3.86	6.62	24.79	0.46
	13.18	8.25	13.92	18.33	7.10	14.45	24.77		
紀文沼0708	0.86	0.80	1.13	1.41	0.45	1.08	1.29	7.02	0.32
	12.33	11.42	17.61	22.02	5.85	14.04	16.74		
紀文沼0711	3.08	1.97	2.20	3.19	1.75	3.35	7.86	23.40	0.55
	13.54	8.67	10.56	15.35	7.01	13.41	31.47		
紀文沼0804	9.95	6.32	5.49	10.86	5.56	10.07	19.49	67.73	0.51
	15.04	9.55	9.08	17.96	7.65	13.87	26.85		
紀文沼0809	1.57	0.79	1.37	2.22	0.44	1.07	1.99	9.45	0.20
	16.57	8.31	15.77	25.62	4.22	10.33	19.18		
沼川橋0711	13.36	14.85	7.62	19.90	16.67	27.67	31.28	131.34	0.84
	10.50	11.68	6.55	17.10	11.94	19.82	22.41		
沼川橋0804	11.38	8.22	6.03	15.80	6.22	14.17	22.04	83.86	0.39
	13.86	10.01	8.03	21.03	6.90	15.72	24.46		

表 7. 糖収量 (Mol%) 主成分分析

主成分	固有値	寄与率	累積寄与率
1	2.6091	37.273	37.273
2	2.2079	31.541	68.815
3	1.3108	18.725	87.54
4	0.5458	7.798	95.338
5	0.2238	3.198	98.535
6	0.1025	1.465	100
7	0	0	100

固有ベクトル	1	2	3
Rha	0.37	0.24	-0.41
Fuc	0.088	-0.23	0.77
Ara	0.50	-0.09	-0.23
Xyl	0.56	-0.10	0.20
Man	-0.19	0.61	0.012
Gal	-0.051	0.61	0.31
Glc	-0.50	-0.36	-0.21

試料	主成分1	主成分2	主成分3
Lebang0712	0.50	1.71	-1.23
Lebang0808	0.030	2.45	-1.88
Bakong0712	-0.30	1.80	-0.74
Bakong0808	-0.43	1.96	0.36
霧多布0711	-0.74	-1.20	0.011
霧多布0806	2.53	-0.59	0.45
チライカリベツ0708	-3.50	-2.86	-1.25
チライカリベツ0711	-0.61	0.22	0.18
チライカリベツ0806	1.32	-0.31	0.39
チライカリベツ0809	0.12	-0.46	-0.27
紀文沼0708	1.92	-1.16	1.33
紀文沼0711	-1.21	-0.83	-0.39
紀文沼0804	-0.47	-0.31	0.11
紀文沼0809	2.88	-1.58	-0.95
沼川橋0711	-1.89	1.44	2.82
沼川橋0804	-0.15	-0.27	1.05

3-6 赤外線吸収スペクトル

表 8 に、北海道試料とマレーシア試料における赤外線吸収スペクトルのピークの帰属を示した。

図 19 にマレーシア試料と北海道試料の赤外線吸収スペクトルの一例として、チライカリベツ 2007 年 11 月試料と Bakong2007 年 12 月試料の赤外線吸収スペクトルを示した。マレーシア試料は、北海道試料ではみられなかった脂肪族 C-H 伸縮振動による 2920 cm^{-1} 付近の吸収や、水素結合した強いカルボキシル基による 2600 cm^{-1} 付近の吸収や、カルボキシル基の C=O 伸縮振動による 1720 cm^{-1} 付近の吸収などがみられた。他方、北海道試料においては、多糖類の OH 伸縮振動による 1050 cm^{-1} 付近の吸収が、マレーシア試料よりもシャープであった。ただし、マレーシア試料相互間や北海道試料相互間での地域差、季節変化はほとんど認められなかった。

表 9 は、脂肪族、カルボキシル基、芳香族、多糖類に由来するピークの面積の割合である。これは、日本分光 (Jasco) スペクトルマネージャのカーブフィッティングプログラムにより、ピークを解析・分離し、脂肪族、カルボキシル基、芳香族、多糖類に由来するピークに振りわけ、各面積の割合を求めたものである。

北海道試料においては、多糖類の割合が一番高く、マレーシア試料においては、芳香族の割合が一番高かった。また、マレーシア試料は北海道試料に比べてカルボキシル基の占める割合が高かった。マレーシア試料相互間でも、Lebang 試料より Bakong 試料の方がカルボキシル基の占める割合が高かった。開発の進む Bakong では有機物の分解が進行した結果、溶存有機物中のカルボキシル基含量が増加したものと考えられる。ただし、各地域において季節による著しい変化はみられなかった。

表 8. ピークの帰属

ピーク	ピークの帰属	由来する官能基	マレーシア	北海道
1	水素結合したO-H基由来	多糖類	3362	3397
2	芳香環のC-H伸縮	芳香族	3248	N.D.*
3	脂肪族性C-H伸縮	脂肪族	2940	2950
4	水素結合した強いカルボキシル	カルボキシル基	2600	N.D.*
5	カルボキシル基のC=O伸縮	カルボキシル基	1718	N.D.*
6	芳香環のC=C伸縮	芳香族	1618	1604
7	C-H変角振動およびCH ₃ 対称・ 逆対称伸縮	脂肪族	1398	1399
8	カルボキシル基のC-O伸縮振 動とC-H変角振動	カルボキシル基	1266	1259
9	カルボキシル基のC-O伸縮振 動とC-H変角振動	カルボキシル基	1221	N.D.*
10	多糖類のOH伸縮振動	多糖類	1077	1054
11	芳香族C-Hに由来	芳香族	773	779

*非検出 (cm⁻¹)

表 9. 脂肪族、カルボキシル基、芳香族、多糖類に由来するピークの
面積割合

試料	脂肪族	カルボキシル基	芳香族	多糖類
チライカリベツ0708	18.5	4.4	26.7	50.5
チライカリベツ0711	20.4	3.8	17.8	58.0
チライカリベツ0806	12.5	5.6	26.4	55.5
チライカリベツ0809	22.0	4.2	25.2	48.5
紀文沼0708	23.4	0.0	16.0	60.6
紀文沼0711	25.7	5.6	25.4	43.4
紀文沼0804	24.9	5.3	23.8	46.0
紀文沼0809	23.2	5.0	27.5	44.4
霧多布0711	22.8	6.4	26.5	44.3
霧多布0806	13.4	6.6	27.5	52.6
沼川橋0711	15.8	2.8	18.1	63.3
沼川橋0804	20.6	7.4	19.4	52.6
Bakong0712	25.8	21.7	33.5	19.0
Bakong0808	24.0	28.5	31.3	16.2
Lebang0712	21.8	14.4	43.0	20.7
Lebang0808	22.5	12.2	35.3	30.1

(%)

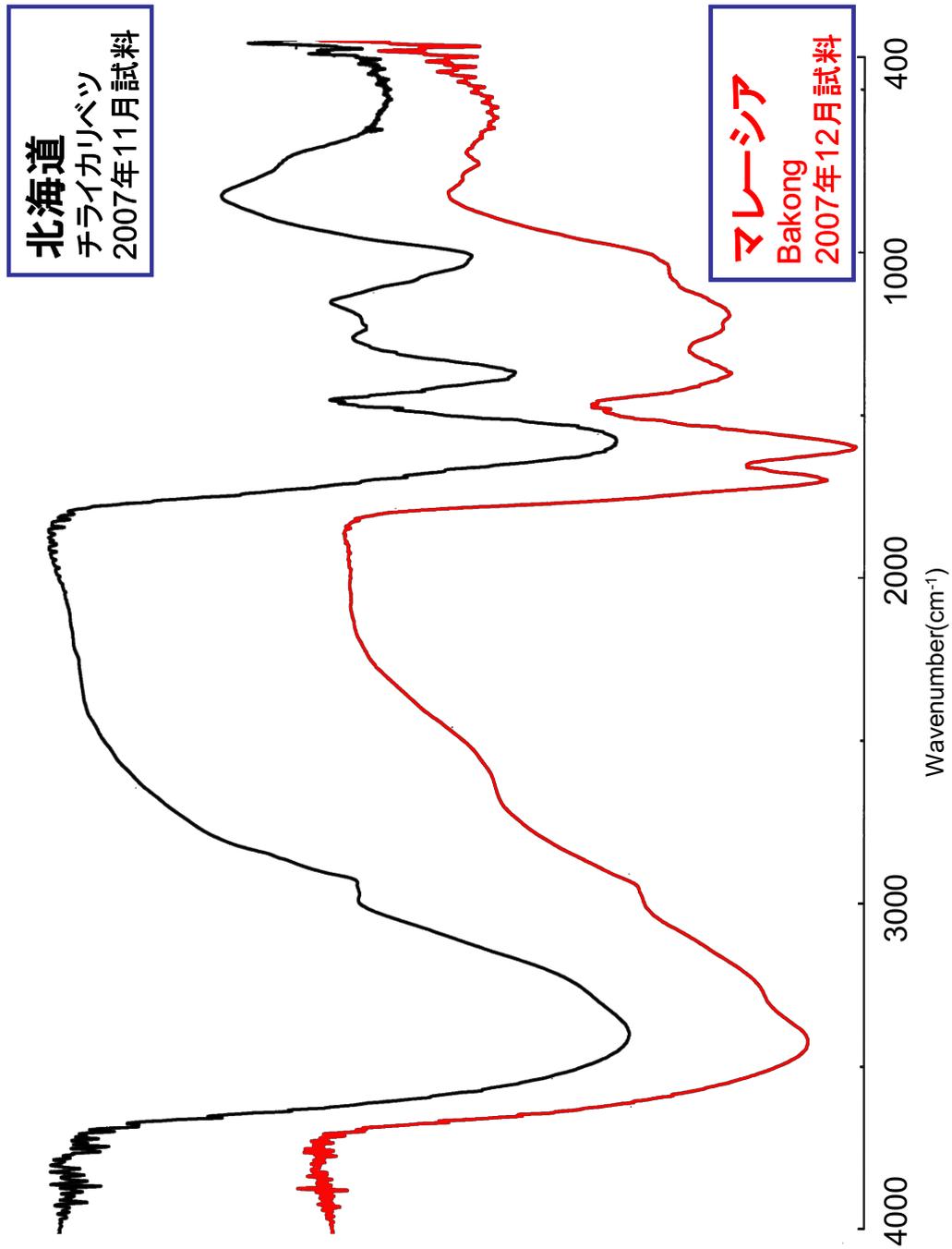


図 19. 赤外線吸収スペクトル 一例

3-7 元素分析

表 10 に元素分析の結果を示した。

マレーシア試料の灰分含量の平均値は 4.28% で、北海道試料の灰分含量の平均値は 17.94% であった。

マレーシア試料と北海道試料の平均元素組成とその標準偏差を表 11 に示した。

原子数比で見ると、炭素含量は 5% 程度、水素含量は 4% 程度、酸素含量は 1% 程度、北海道試料よりマレーシア試料の方が高かった。逆に、窒素含量は約 2 倍、硫黄含量は約 3 倍、マレーシア試料より北海道試料の方が高かった。

各試料の H/C 原子数比と O/C 原子数比の相関図を図 20 に示した。湿原水溶性有機物の H/C-O/C プロットは、筒木・熊田(1980)が示した H/C-O/C プロットにおけるフルボ酸の分布領域(O/C 0.6-1.0、H/C 0.7-1.4)とよく一致していた。マレーシア試料の H/C 原子数比の平均値(0.99 ± 0.27)と O/C 原子数比の平均値(0.70 ± 0.010)は、北海道試料の H/C 原子数比の平均値(1.33 ± 0.085)と O/C 原子数比の平均値(0.79 ± 0.55)よりともに低かった。紀文沼 2007 年 8 月試料のみ他の試料と比べて O/C 原子数比、H/C 原子数比ともに高い値を示した。この試料は巨大な分子サイズ画分を含んでいた試料であるが、元素組成からはこの巨大な分子成分に対する多糖類の貢献が示唆される。

各試料の H/C 原子数比と N/C 原子数比の相関図を図 21 に示した。マレーシア試料の N/C 原子数比の平均値(0.018 ± 0.0013)は、北海道試料の N/C 原子数比の平均値(0.039 ± 0.0068)より低く、マレーシア試料の方が北海道試料より H/C 原子数比と N/C 原子数比ともに低かった。北海道試料の N/C 原子数比の範囲は広がった (0.29~0.51)。元素組成から判断すると、マレーシア試料におけるタンパク質の貢献は北海道試料よりも低いと考えられる。

N/S 原子数比においては、北海道試料よりマレーシア試料の方が約 2 倍高い値を示した。紀文沼 2008 年 4 月試料のみマレーシア試料と同様の値を示した。

表 10. 元素組成

	上段:重量% 下段:原子数%					原子数比			
	C%	H%	N%	O%	S%	N/C	O/C	H/C	N/S
Bakong0712	49.34	3.91	0.94	45.63	0.19				
	37.57	35.71	0.61	26.05	0.05	0.016	0.69	0.95	11.5
Bakong0808	49.14	4.14	1.06	45.46	0.20				
	36.68	37.13	0.68	25.45	0.06	0.018	0.69	1.01	12.3
Lebang0712	48.85	4.02	1.10	45.82	0.21				
	36.89	36.40	0.71	25.95	0.06	0.019	0.70	0.99	12.0
Lebang0808	48.53	4.06	1.04	46.17	0.20				
	36.53	36.67	0.67	26.07	0.06	0.018	0.71	1.00	11.9
霧多布0708	44.96	4.97	1.60	47.92	0.56				
	31.64	41.95	0.97	25.29	0.15	0.031	0.80	1.33	6.6
霧多布0711	46.37	5.09	2.01	45.71	0.82				
	32.25	42.51	1.20	23.84	0.21	0.037	0.74	1.32	5.6
霧多布0806	47.08	4.85	1.62	45.68	0.78				
	33.34	41.22	0.98	24.26	0.21	0.029	0.73	1.24	4.8
チライ0708	44.03	4.87	2.00	48.53	0.57				
	31.26	41.52	1.22	25.85	0.15	0.039	0.83	1.33	8.0
チライ0711	45.13	5.14	2.30	46.73	0.70				
	31.31	42.83	1.37	24.31	0.18	0.044	0.78	1.37	7.5
チライ0806	45.58	4.83	1.84	47.01	0.75				
	32.41	41.19	1.12	25.07	0.20	0.035	0.77	1.27	5.7
チライ0809	45.74	4.78	1.81	47.15	0.52				
	32.63	40.90	1.11	25.23	0.14	0.034	0.77	1.25	8.0
紀文沼0708	40.78	5.30	1.68	51.63	0.61				
	28.16	43.95	0.99	26.74	0.16	0.035	0.95	1.56	6.3
紀文沼0711	45.47	5.00	2.30	46.42	0.82				
	31.91	42.06	1.38	24.43	0.21	0.043	0.77	1.32	6.4
紀文沼0804	45.57	5.21	2.71	46.00	0.50				
	31.39	43.11	1.60	23.77	0.13	0.051	0.76	1.37	12.5
紀文沼0809	45.77	4.71	1.76	47.09	0.66				
	32.83	40.57	1.08	25.34	0.18	0.033	0.77	1.24	6.1
沼川橋0711	44.63	4.98	2.31	47.04	1.04				
	31.41	42.09	1.40	24.83	0.27	0.044	0.79	1.34	5.1
沼川橋0804	45.36	5.22	2.53	45.97	0.92				
	31.27	43.22	1.50	23.78	0.24	0.048	0.76	1.38	6.3

表 11. 元素組成の平均値

	上段:重量% 下段:原子数%				
	C%	H%	N%	O%	S%
マレーシア	49.0±0.35	4.0±0.10	1.0±0.070	45.8±0.30	0.20±0.0093
	36.9±0.46	36.5±0.59	0.67±0.042	25.9±0.29	0.056±0.0025
北海道	45.1±1.5	5.0±0.19	2.0±0.36	47.1±1.59	0.71±0.16
	31.7±1.25	42.1±1.0	1.2±0.21	24.8±0.88	0.19±0.44

	原子数比			
	N/C	O/C	H/C	N/S
マレーシア	0.018±0.0013	0.70±0.010	0.99±0.27	11.9±0.35
北海道	0.039±0.0068	0.79±0.55	1.33±0.085	6.8±2.0

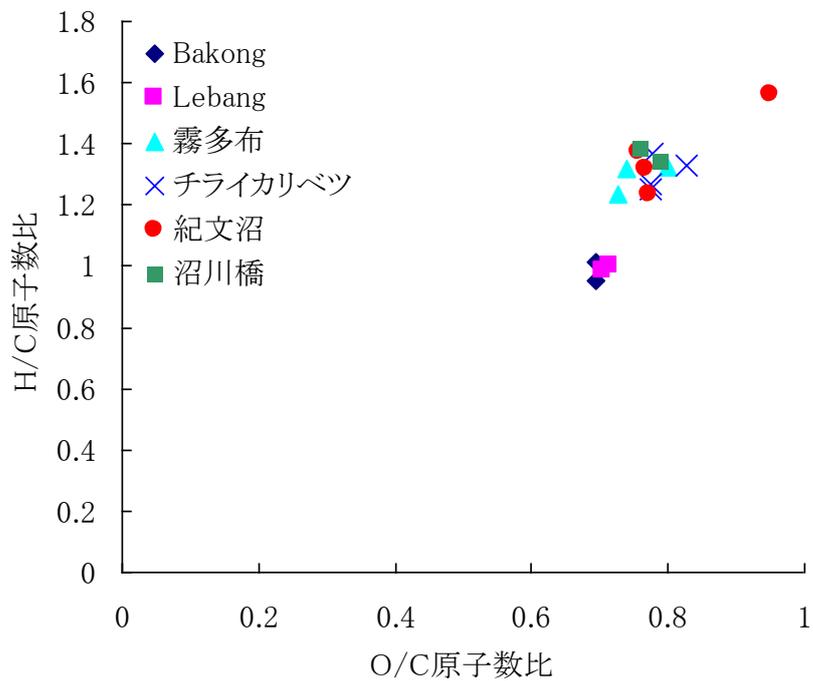


図 20. H/C 原子数比と O/C 原子数比の相関図

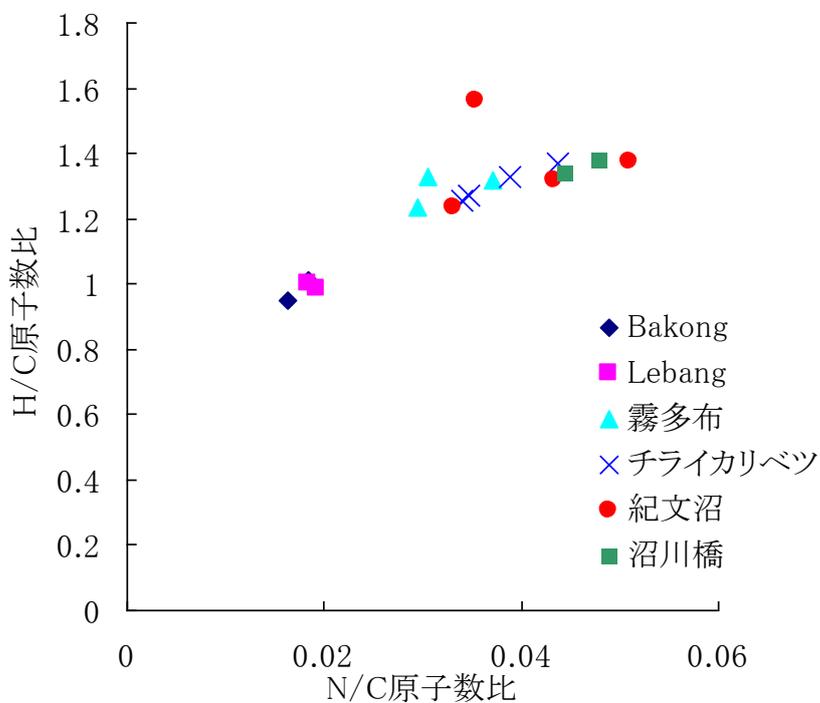


図 21. H/C 原子数比と N/C 原子数比の相関図

表 12 に原子数%の主成分分析の結果を示した。

主成分 1 に対しては水素と窒素の固有ベクトルの貢献が大きかった。主成分 1 の寄与率は 76.4%であった。主成分 1 の大きさは、霧多布 2007 年 11 月試料<紀文沼 2007 年 11 月試料<チライカリベツ 2007 年 11 月試料<紀文沼 2008 年 4 月試料<沼川橋 2007 年 11 月試料<沼川橋 2008 年 4 月試料の順に増大した。他方、マレーシア試料において、主成分 1 はマイナスの値だった。これより、北海道の寒い時期に水素含量と窒素含量が高いことを示した。

主成分 2 に対しては酸素の固有ベクトルの貢献が大きかった。主成分 2 の寄与率は 16.1%であった。主成分 2 の大きさは、紀文沼 2007 年 8 月試料の値が 1 番高く、次にチライカリベツ 2007 年 11 月試料が高かった。このほかに、プラスの値を示したのは、霧多布 2007 年 8 月試料、チライカリベツ 2008 年 6 月試料、チライカリベツ 2008 年 9 月試料、紀文沼 2008 年 9 月試料だった。これより、北海道の暑い時期に酸素含量が高いことを示した。

主成分 3 に対してはイオウの固有ベクトルの貢献が大きかった。主成分 3 の寄与率は 5.28%であった。主成分 3 の大きさは、マレーシアでは北海道よりも低い傾向にあったが、北海道試料の中でも季節ごとに大きく変動した。しかしその変動の要因については明らかな傾向が認められなかった。

表 12. 元素組成（原子数%） 主成分分析

主成分	固有値	寄与率	累積寄与率
1	3.8184	76.367	76.367
2	0.8044	16.088	92.455
3	0.2642	5.284	97.739
4	0.113	2.261	100
5	0	0	100

固有ベクトル	1	2	3
C%	-0.45	-0.53	0.17
H%	0.49	0.27	-0.19
N%	0.48	-0.16	-0.39
O%	-0.35	0.78	0.13
S%	0.46	-0.030	0.88

試料	主成分1	主成分2	主成分3
Bakong0712	-3.60	-0.34	0.11
Bakong0808	-2.83	-0.57	-0.20
Lebang0712	-3.11	-0.28	-0.053
Lebang0808	-3.12	-0.047	-0.064
霧多布0708	0.10	0.65	-0.081
霧多布0711	1.48	-0.84	0.26
霧多布0806	0.50	-0.71	0.68
チライ0708	0.30	1.03	-0.26
チライ0711	1.57	-0.27	-0.39
チライ0806	0.50	0.11	0.45
チライ0809	-0.08	0.21	-0.25
紀文沼0708	0.63	2.83	-0.15
紀文沼0711	1.52	-0.40	0.14
紀文沼0804	1.83	-0.84	-1.48
紀文沼0809	0.010	0.22	0.34
沼川橋0711	1.87	0.025	0.90
沼川橋0804	2.43	-0.79	0.045

3-8 3次元蛍光スペクトル

表 13 に PARAFAC 解析により分類された 5 つのピークを示した。

図 20 に示す C1 は、フルボ酸様ピークと考えられ、2 つのピークは、それぞれ励起波長 < 260nm、蛍光波長 460nm と励起波長 340nm、蛍光波長 460nm に相当する。図 21 に示す C2 は、腐植酸様ピークと考えられ、励起波長 270nm、蛍光波長 520nm に相当する。図 22 に示す C3 は、微生物由来ピークと考えられ、2 つのピークは、それぞれ励起波長 < 260nm、蛍光波長 400nm と励起波長 310nm、蛍光波長 400nm に相当する。図 23 に示す C4 は、光分解由来ピークと考えられ励起波長 < 260nm、蛍光波長 470nm に相当する。図 24 に示す C5 は、タンパク様物質およびタンニン等のある種のフェノールに由来ピークと考えられ、励起波長 < 260nm、蛍光波長 330nm に相当する。

表 13. PARAFAC 解析により分類されたピーク

Component		励起波長 最大(nm)	蛍光波長 最大(nm)
1	フルボ酸様ピーク	<260 (340)	460
2	腐植酸様ピーク	270	520
3	微生物由来ピーク	<260 (310)	400
4	光分解由来ピーク	<260	470
5	タンパク質様ピーク	<260	330

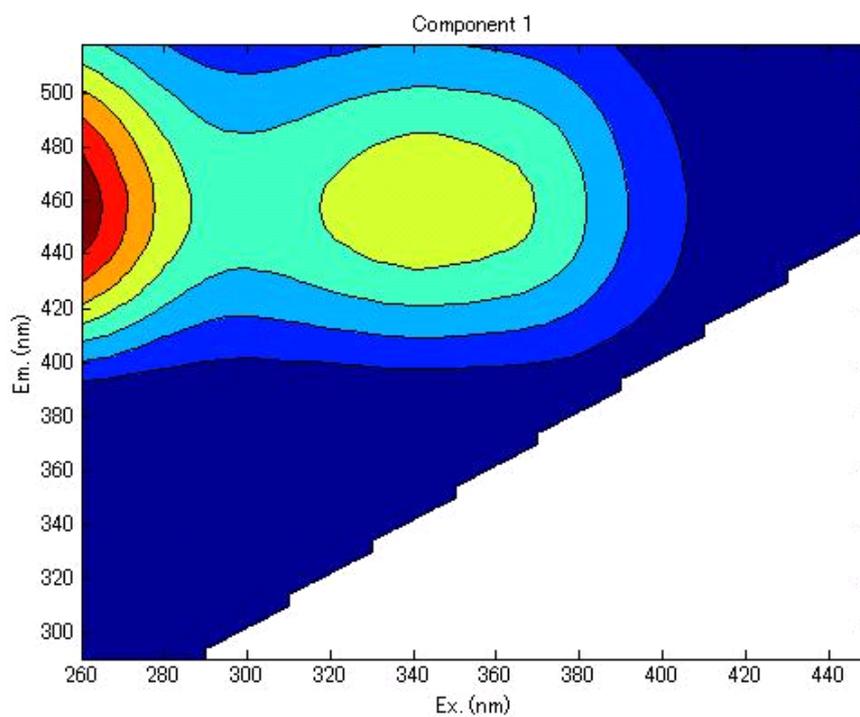


図 20. PARAFAC 解析による Component1

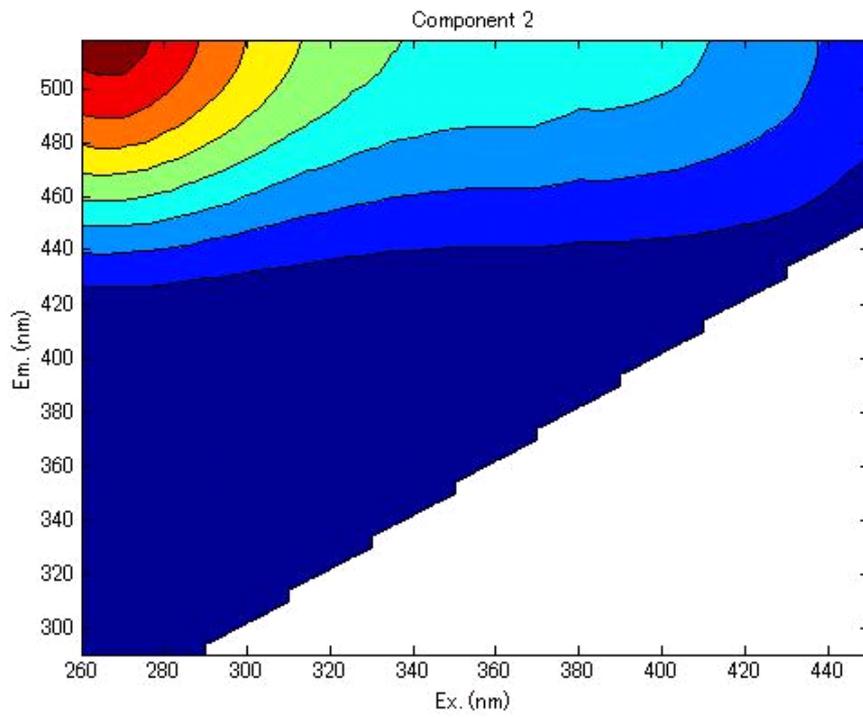


図 21. PARAFAC 解析による Component2

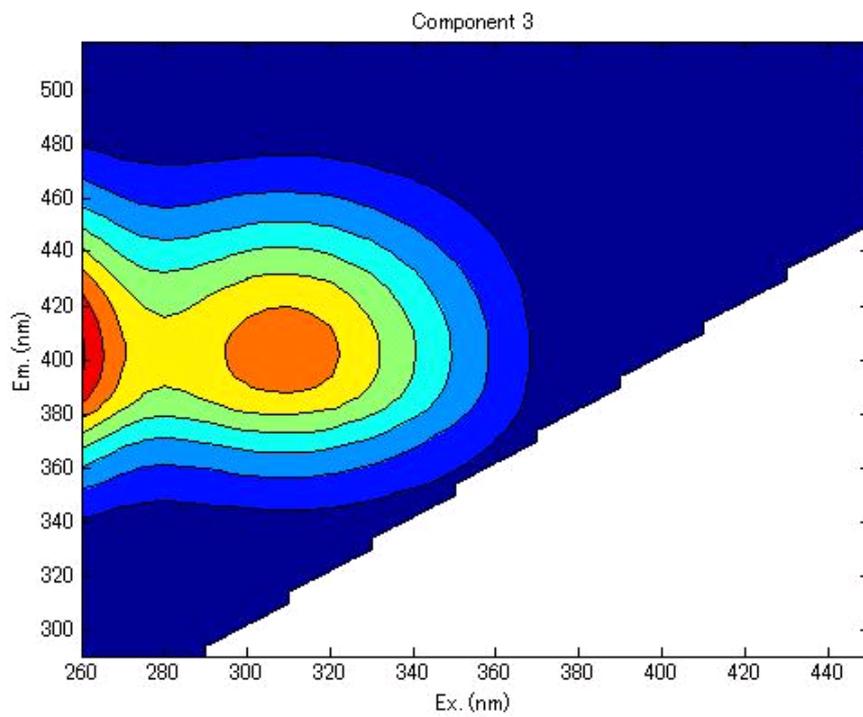


図 22. PARAFAC 解析による Component3

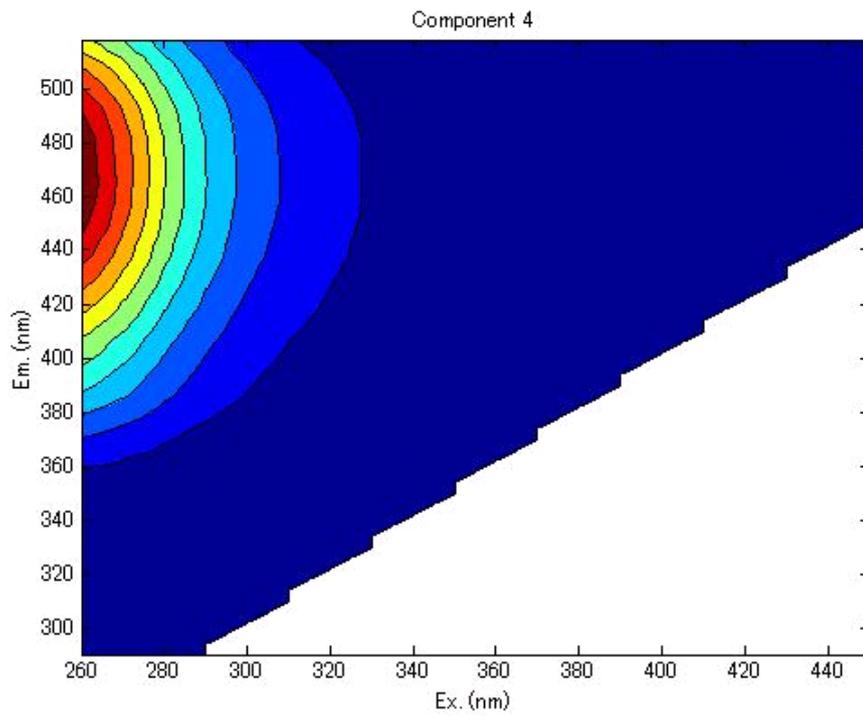


図 23. PARAFAC 解析による Component4

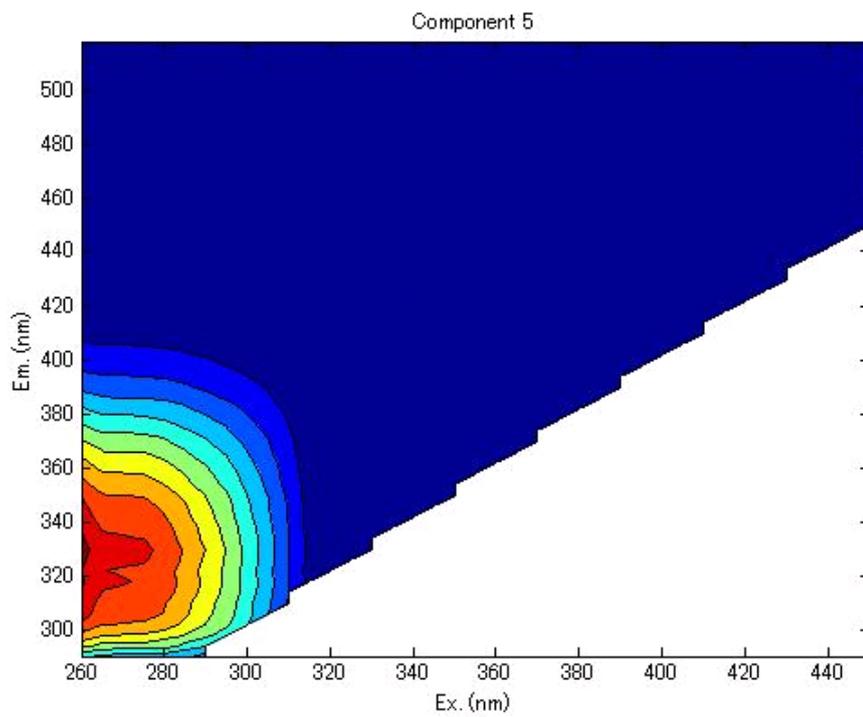


図 24. PARAFAC 解析による Component5

ゲル浸透クロマトグラフィーを行いフラクションに分けた5つの試料（霧多布 2008年6月、チライカリベツ 2008年6月、紀文沼 2008年4月、Lebang 2008年8月、Bakong 2008年8月）の蛍光強度を比較した。

Toyoparl-HW50F カラムの溶出曲線のピークでは、マレーシア試料がシャープな単一ピークをもち、北海道試料は浸透画分のメインピークの他に排除画分にピークをもっていたが、それとは異なり、C1からC4の溶出曲線では、北海道試料が単一ピークで、マレーシア試料が高分子量画分に肩状ピークをもっていた。C5の溶出曲線は、試料によって多様であった。

フルボ酸様ピークと考えられるC1ピークと微生物由来ピークと考えられるC3ピークでは、霧多布試料が最も高いピークを示し、チライカリベツ試料>紀文沼試料>Bakong 試料>Lebang 試料の順にピークが低くなっていった。

腐植酸様ピークと考えられるC2ピークでは、チライカリベツ試料と Bakong 試料が最も高いピークを示し、霧多布試料>Lebang 試料>紀文沼試料の順に低くなっていった。

光分解由来ピークと考えられるC4ピークでは、チライカリベツ試料が最も高いピークを示し、霧多布試料>紀文沼試料>Bakong 試料>Lebang 試料の順にピークが低くなっていった。

タンパク質様物質由来ピークと考えられるC5ピークでは、マレーシア試料には明瞭なピークはみられなかった。北海道試料では浸透画分と排除画分にC5成分のピークがみられ、浸透画分のピークは、霧多布試料が最も高かった。

この傾向は、プロテインアッセイ法で、マレーシア試料のタンパク質様物質濃度が高かったことと矛盾している。これは、プロテインアッセイ法では腐植物質からの貢献を排除できていないが、3次元蛍光スペクトルの PARAFAC 解析においては腐植物質からの貢献を統計的な手法によって取り除いており、PARAFAC 解析による C5 成分の方がタンパク質成分の実際の貢献度をよりよ

く反映していると考えられる。ただし、C5成分においてもタンパク質とタンニン様フェノール性化合物の両方の貢献が推定されている(Maie et al. 2007)。この論文によると、タンパク質は分子量の大きな排除画分のT1ピークに、タンニン様フェノール性化合物はより低分子のT2ピークに貢献している。本研究の結果でも北海道試料におけるC5成分の溶出曲線は排除画分と浸透画分にピークを示し、これらの結果から、排除画分におけるC5成分はほぼ純水にタンパク質に由来すると推定することが可能であろう。

霧多布試料を除いて、マレーシア試料と北海道試料のC1からC4のピークの溶出容積は、北海道試料のToyopearl-HW50Fカラムの溶出曲線ピークの溶出容積と同じ約45mLであった。霧多布試料だけは、やや低分子量側の48mL付近にピークがみられた。

マレーシア試料においては、5つのピークの中で腐植酸様ピークと考えられるC2ピークの占める割合が高く、他方北海道試料ではフルボ酸様ピークと考えられるC1ピークの占める割合が高かった。

各地点の季節ごとの蛍光強度を比較した。

マレーシア試料は、どのピークにおいても季節変化にあまり違いは示されなかったが、C1ピークにおいて、Lebang試料とBakong試料の両方で、乾季より雨季の方が高い傾向を示した。

北海道試料は、各ピークによって季節変化が示された。C1～C3ピークは同じ傾向を示した。紀文沼試料を除いた霧多布試料、チライカリベツ試料、沼川橋試料において、秋(11月)に値が最も低くなり、夏(8・9)月に最も値が高くなった。紀文沼試料においては、季節変化による傾向の違いは示されなかった。C4ピークはどの試料においても、秋(11月)に最も値が低く、夏(8月)に値が最も高くなった。C5ピークは、各地域によって最大値と最小値を示す時期が違い、共通した季節変化は認められなかった。

紀文沼 2007 年 8 月試料においては、元素分析により灰分の値も高く、金属イオンとの錯体形成により、溶存有機物の蛍光の消光が起こった可能性がある。

3-8-1 蛍光インデックス

表 14 に各試料の蛍光インデックスの値を示した。

蛍光インデックスは、励起波長 370nm で、470nm の蛍光強度を 520nm の蛍光強度で割った値である。南極大陸の陸成の有機物の貢献がほとんどない湖水中の溶存有機物とアメリカ合衆国内各地の陸成起源の有機物の貢献が大きい湖水および河川水中の溶存有機物の蛍光強度を比較することにより、この蛍光インデックスが高い場合は微生物由来の有機物の割合が高く、低い場合は陸成の土壌や泥炭に由来する有機物の割合が高いと推定された (McKnight et al. 2001)。ただし、蛍光インデックスの波長についてはその後修正が行われた (Jaffé et al. 2008)

蛍光インデックスの平均値は、マレーシア試料 (0.98 ± 0.040) より北海道試料 (1.31 ± 0.052) の方が高い値を示した。このことは、溶存有機物の分解される速さの違いが影響していると考えられる。熱帯に属するマレーシアは、湿原に生育する泥炭地植物から泥炭が形成されるまでが速く、分解生成物の相対的な滞留時間が短いため、溶存有機物は泥炭自体の分解生成物の貢献が大きくなる。一方、冷温帯に属する北海道では、泥炭地植物から泥炭が形成されるまでに時間がかかり、泥炭地植物から微生物によって生成される分解生成物が溶存有機物に大きく貢献しているため、マレーシア試料と北海道試料の蛍光インデックスに違いがみられたと考えられる。

図 25 に、北海道試料の蛍光インデックスの季節変化を示した。全体的な傾向として、蛍光インデックスの季節変化は、夏に最も値が高く、秋にかけて値が低くなり、春に最も値が低いという傾向を示した。

夏の盛んな微生物活性による影響で、微生物に由来する有機物の割合が夏に高くなり、蛍光インデックスの値も高くなったと考えられる。PARAFAC解析の C3（微生物由来）ピークが同様の傾向を示したことから同様の考察が可能である。

表 14. 蛍光インデックス

試料	FI
Bakong0712	1.02
Bakong0808	1.01
Lebang0712	0.93
Lebang0808	0.96
霧多布0708	1.36
霧多布0711	1.36
霧多布0806	1.31
チライカリベツ0708	1.35
チライカリベツ0711	1.29
チライカリベツ0806	1.23
チライカリベツ0809	1.28
紀文沼0708	1.39
紀文沼0711	1.38
紀文沼0804	1.28
紀文沼0809	1.31
沼川0711	1.28
沼川0804	1.23
平均	
マレーシア	0.98±0.040
北海道	1.31±0.052

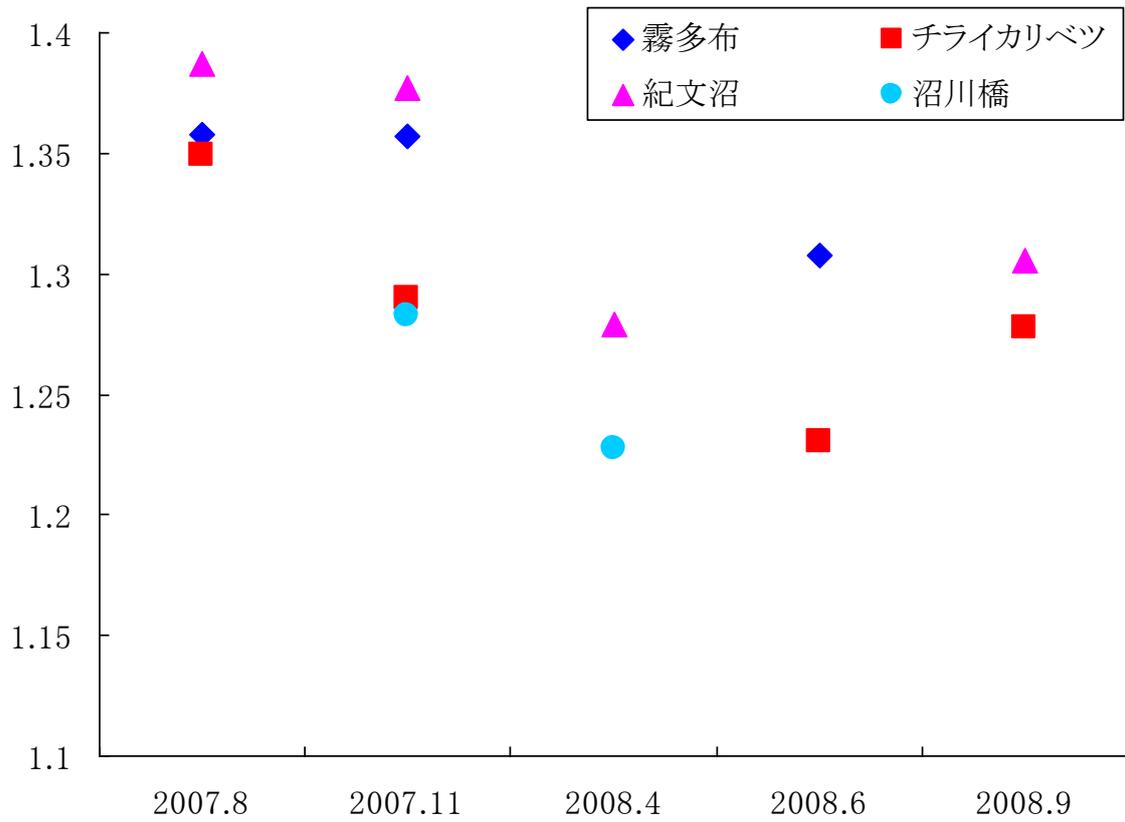


図 25. 北海道試料における蛍光インデックスの季節変化

第4章 要約

本研究は、各気候帯における湿原水溶存有機物の組成・構造特性を明らかにし、その地域差と季節変化を考察したものである。湿原水は、マレーシア・サラワク州（熱帯）と北海道東部（冷温帯）の2地点で採取した。マレーシアにおいては、開発が始まり人為的影響がある湿地林を流れる Bakong 川と自然状態に近く人為的影響が少ない湿地林を流れる Lebang 川の2カ所で採取した。北海道東部においては、人的影響が少なく、環境の異なる湿原ということを考慮し、霧多布湿原・泥川、別寒辺牛湿原・チライカリベツ川、十勝川河口域湖沼群紀文沼・沼川橋の4カ所で採取した。

マレーシア試料の分子量分布は非常にシャープであった。一方、北海道試料においては、高分子量画分を含む幅の広い分子量分布であった。各試料の糖含量は、マレーシアにおいて雨季より乾季が高く、Lebang 試料より Bakong 試料の方が高かった。北海道は沼川橋試料の糖含量が最も高く、北海道試料においては、糖含量は夏に高く、春・秋に低くなるという季節変化を示した。赤外線吸収スペクトルからは、北海道試料においては多糖類の割合が高く、マレーシア試料においては芳香族の占める割合が高いという傾向が示された。溶存有機物の3次元蛍光スペクトルの PARAFAC 解析により5つの成分が示された。PARAFAC 解析によって示された5つの成分の中で、マレーシア試料においては腐植酸様成分の割合が高く、北海道試料においてはフルボ酸様成分の割合が高かった。溶存有機物の給源を示す蛍光インデックス（励起波長 370 nm での 470nm/520nm 蛍光強度）は、マレーシア試料で低く、北海道試料で高かった。このことから、マレーシア試料の溶存有機物には泥炭由来の有機物の貢献が大きく、北海道試料においては、泥炭地植物の微生物分解生成物の貢献が大きいと推察した。

今回の研究では、溶存有機物と微量金属元素との錯体形成について分析していないが、溶存有機物のより正確な分子量・分子量分布を測定し、溶存有機物の錯体形成機能を理解するためには必要である。また、今回の研究では、年に2～3回の試料採取であったが、季節変化の違いをより明らかにするには、同一地点で月1回の試料採取が望ましく、長期的研究も重要である。

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始懇切丁寧なご指導と校閲の労を取られました帯広畜産大学 筒木潔教授に心より感謝の意を表します。

また、3次元蛍光スペクトル測定にあたり貴重なご指導、ご助言、ご協力をいただきました北里大学獣医学部生物環境科学科 真家永光講師、ご協力をいただきました名古屋大学大学院生命農学研究科 渡辺彰准教授に厚く御礼申し上げます。そして 環境土壌学研究室の皆様には改めて心より感謝いたします。ありがとうございました。

参考文献

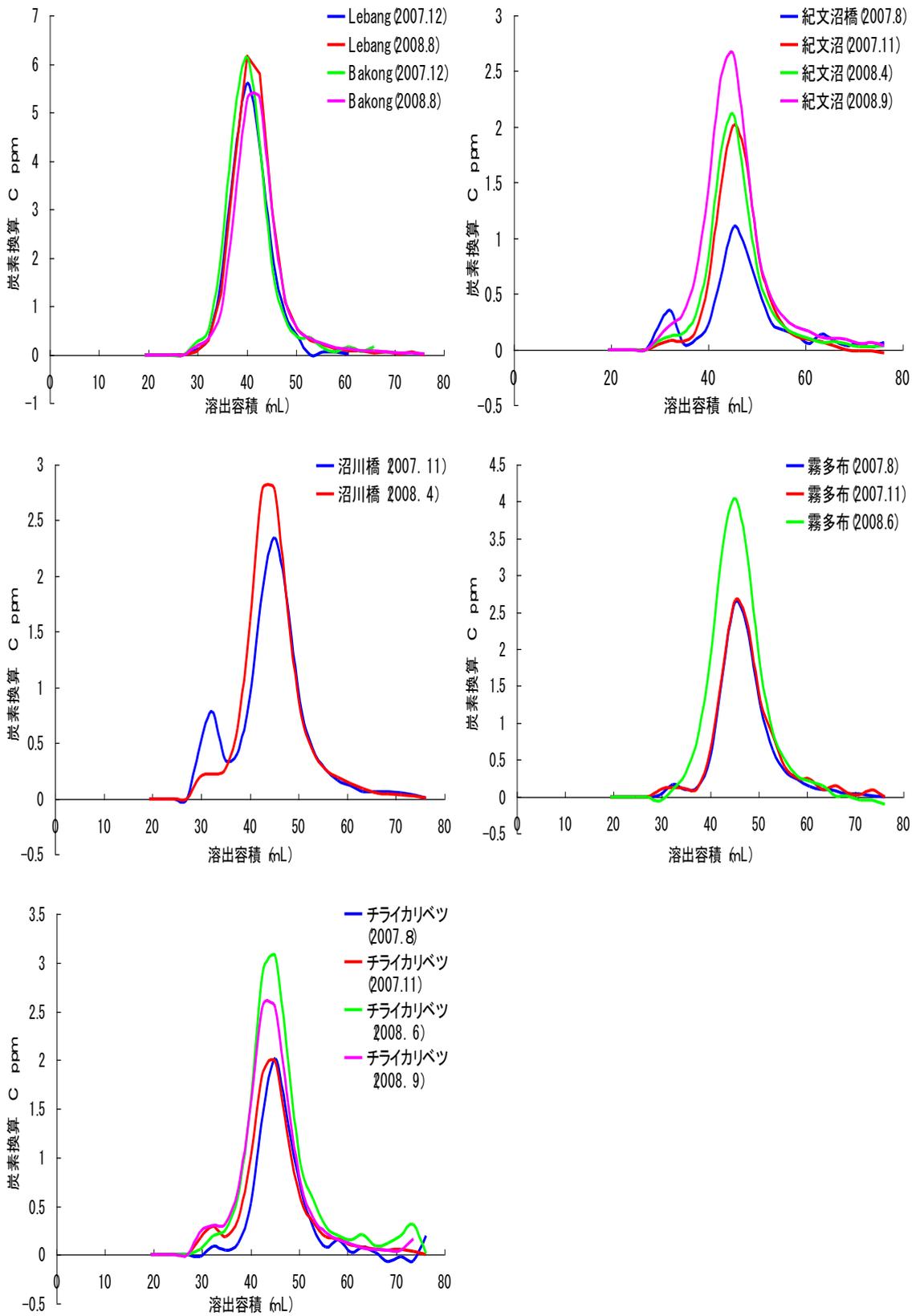
- 1) 天野耕二、松本邦治、今井章雄、松重一夫：河川水中の溶存有機物分画データと流域特性の関係，水環境学会誌，27，659-664（2004）.
- 2) 阿武喜美子、瀬野信子：「糖化学の基礎」，p.197，講談社，東京（1990）.
- 3) Blakeney A. B., P. J. Harris, R. J. Henry, and B. A. Stone: A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis, Carbohydrate Research, 113, 291-299 (1983).
- 4) 福井作蔵：「生物化学実験法1 還元糖の定量法 第2版」，p.206，学会出版センター，東京（1990）.
- 5) 早川和秀、高橋幹夫：琵琶北湖における溶存有機物の動態とCOD増加をとりまく現状，琵琶湖研究所所報，19，42-49（2002）.
- 6) 伊東俊和：ラムサールの波紋 霧多布湿原の新たな息吹北海道ネイチャーマガジン・モーリー，11，28-31（2004）.
- 7) Jaffé R., D. Mcknight, N. Maie, R. Cory, W. H. McDowell, and J.L. Campbell: Spatial and temporal variations in DOM composition in ecosystem: The importance of long term monitoring of optical properties, Journal of Geophysical Research, 113, G04032, doi: 10.1029/2008JG000683（2008）.
- 8) 菅家文左衛門：水田土壌中の炭水化物の挙動，福島県農業試験場研究報告，4，p.38（1988）.
- 9) 小林聡史：ラムサール条約とは 広範囲の自然保護を促す条約の理念，北海道ネイチャーマガジン・モーリー，11，10-14（2004）.
- 10) 小松一弘：三次元励起蛍光スペクトル法を用いた霞ヶ浦湖水の解析，国立環境研究所ニュース，25，7-9（2006）.

- 1 1) 熊田恭一：「土壤有機物の化学（第2版）」, p.304, 学会出版センター , (1981).
- 1 2) Lu X. Q., N. Maie, J. V. Hanna, D. L. Childers and R. Jaffé: Molecular characterization of dissolved organic matter in freshwater wetlands of the Florida Everglades, *Water Research*, 37, 2599-2606 (2003).
- 1 3) Maie N., J. N. Boyer, C. Yang and R. Jaffé: Spatial, geomorphological, and seasonal variability of CDOM in estuaries of the Florida Coastal Everglades, *Hydrobiologia*, 569, 135-150 (2006).
- 1 4) Maie N., N. M. Scully, O. Pisani, and R. Jaffé: Composition of a protein-like fluorophore of dissolved organic matter in coastal wetland and estuarine ecosystems, *Water Research*, 41, 563-570 (2007).
- 1 5) Maie N., O. Pisani, and R. Jaffé: Mangrove tannins in aquatic ecosystem: Their fate and possible influence on dissolved organic carbon and nitrogen cycling, *Limnol. Oceanogr*, 53(1), 160-171 (2008).
- 1 6) McKnight D. M., E. W. Boyer, P. K. Westerhoff, P. T. Doran, T. Kulbe, and D. T. Andersen: Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity, *Limnol. Oceanogr.*, 46(1), 38-48 (2001).
- 1 7) Mladenov N., D. M. McKnight, P. Wolski, and M. Murray-Hudson: Simulation of DOM fluxes in a seasonal floodplain of the Okavango Delta, Botswana, *Ecological Modelling*, 205, 181-195 (2007).
- 1 8) 村山重俊：「農業技術大系－土壤施肥編 第1巻（土壤の働きと根圏環境）」, 農山漁村文化協会, V-113~122 (1987).
- 1 9) 永洞真一郎、三上英敏、石川靖、五十嵐聖貴、藤田隆男、村田清康、坂田康一：釧路湿原における河川水溶存フルボ酸のキャラクタリゼーション,

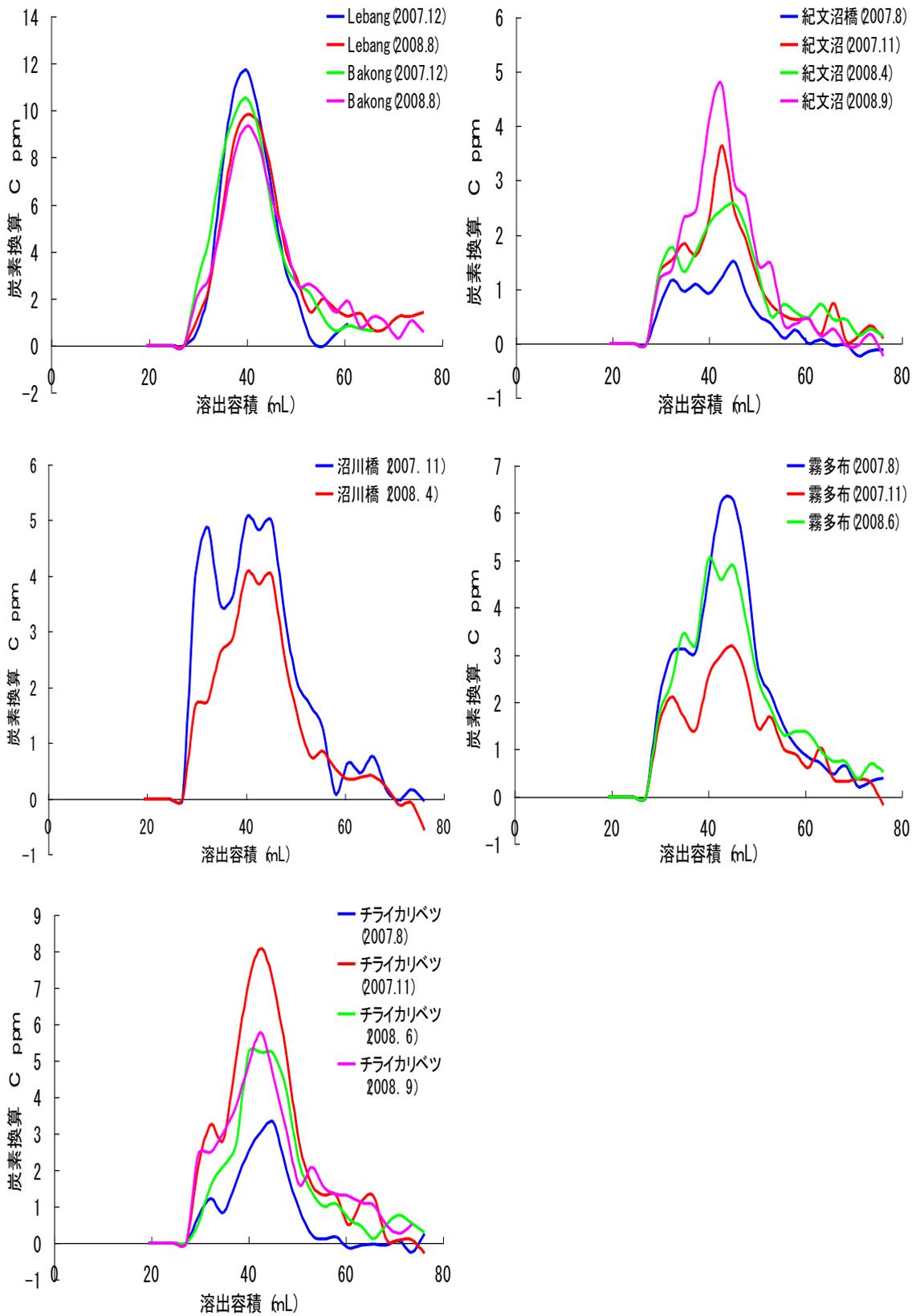
- 水環境学会誌, 25, 229-233 (2002).
- 2 0) Nagao S., T. Matsunaga, Y. Suzuki, T. Ueno, H.Amano: Characteristics of humic substances in the Kuji River waters as determined by high-performance size exclusion chromatography with fluorescence detection, *Water Research*, 37, 4159-4170 (2003).
- 2 1) 長尾誠也: 河川を通しての陸から海への物質輸送－腐植物質の特性と錯形成能, *アムール・オホーツクプロジェクト会報誌*, 3, (2005).
- 2 2) 長岡滋雄: 花の湿原と子どもたち, *北海道ネイチャーマガジン・モーリー*, 7, 23-25 (1999).
- 2 3) 日本腐植物質学会監修／渡辺彰、藤嶽暢英、長尾誠也 編: 「腐植物質分析ハンドブック－標準試料を例にして」, p.142, 三恵社, (2007).
- 2 4) 日本腐植物質学会監修／石渡良志、米林甲陽、宮島徹 編: 「環境中の腐植物質－その特徴と研究法」, p.291, 三共出版, (2008).
- 2 5) 日本化学会 編: 「陸水の化学〔季刊 化学総説 No.14〕」, p.182, 学会出版センター, 東京 (1992).
- 2 6) Scully N. M., N. Maie, S. K. Dailey, J. N. Boyer, R.D. Jones, R. Jaffé: Early diagenesis of plant-derived dissolved organic matter along a wetland, mangrove, estuary ecotone, *Limnol. Oceanogr.*, 49(5), 1667-1678 (2004).
- 2 7) 渋谷辰生: ラムサール登録湿地 厚岸湖・別寒辺牛湿原, *北海道ネイチャーマガジン・モーリー*, 11, 24-27 (2004).
- 2 8) Stedmon C.A., S. Markager, and R. Bro: Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy, *Marine Chemistry*, 82, 239-254 (2003).
- 2 9) 菅原潔、福島正美: 「生物化学実験法 7 蛋白質の定量法 第3版」, p.222,

学会出版センター，東京，(1995).

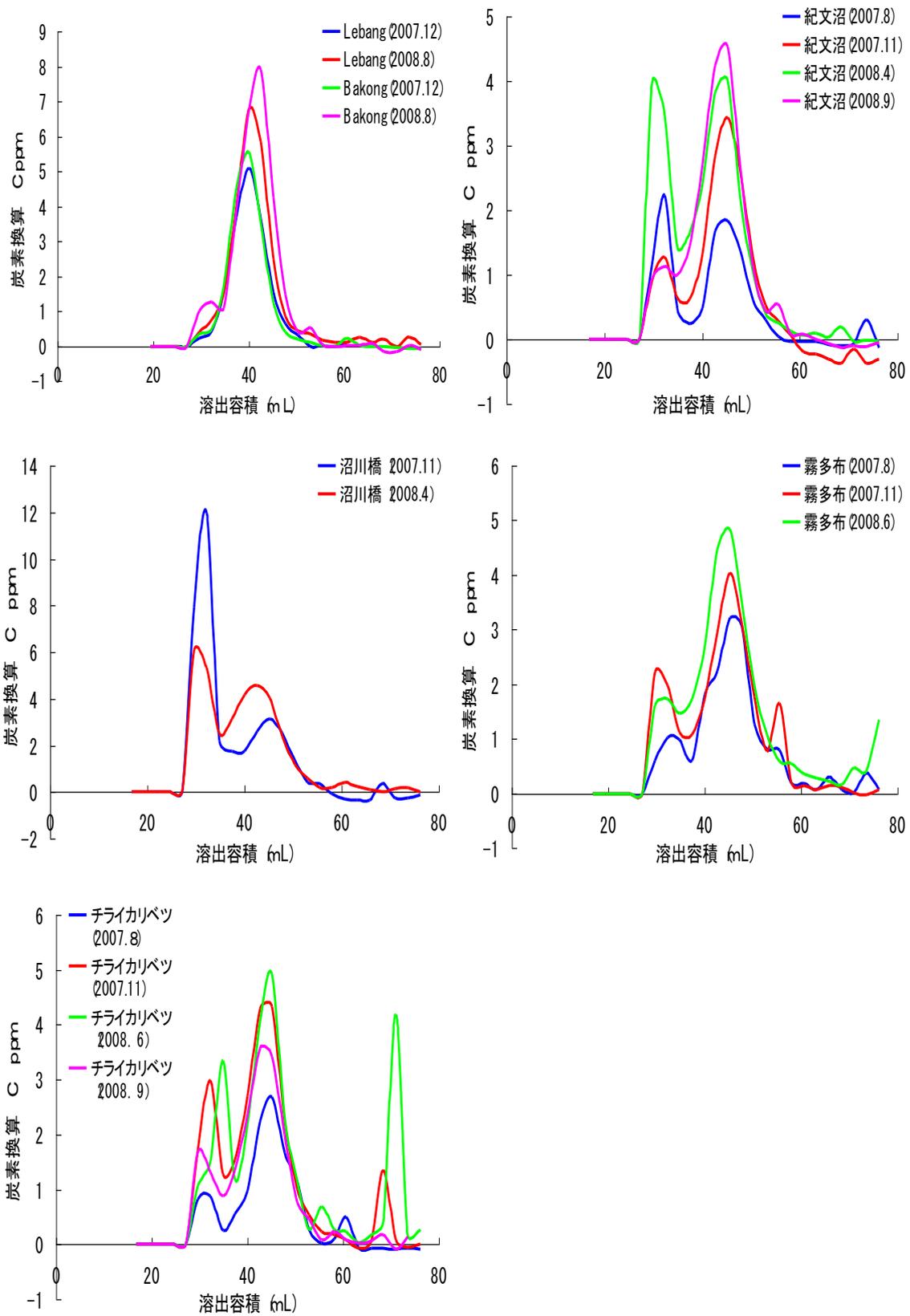
- 3 0) 高橋幹夫：溶存有機物の動態，琵琶湖研究所所報，16，49-52 (1998).
- 3 1) 竹内次夫 森定雄：「ゲルクロマトグラフィー〈基礎編〉」，p.322，講談社，東京 (1972).
- 3 2) 辻井達一：「湿原 成長する大地」，p.204，中央公論社，東京(1987)
- 3 3) 辻井達一：大きな湿原身近な湿原，北海道ネイチャーマガジン・モーリー，7，16-21 (1999).
- 3 4) 辻井達一、橘ヒサ子 編：「北海道の湿原と植物」，p.264，北海道大学図書刊行会 (2003).
- 3 5) 辻井達一、岡田操、高田雅之 編：「北海道の湿原」，p.213，北海道新聞社，(2007).
- 3 6) 筒木潔、熊田恭一：腐植酸の化学，肥料化学，3，91-131 (1980).



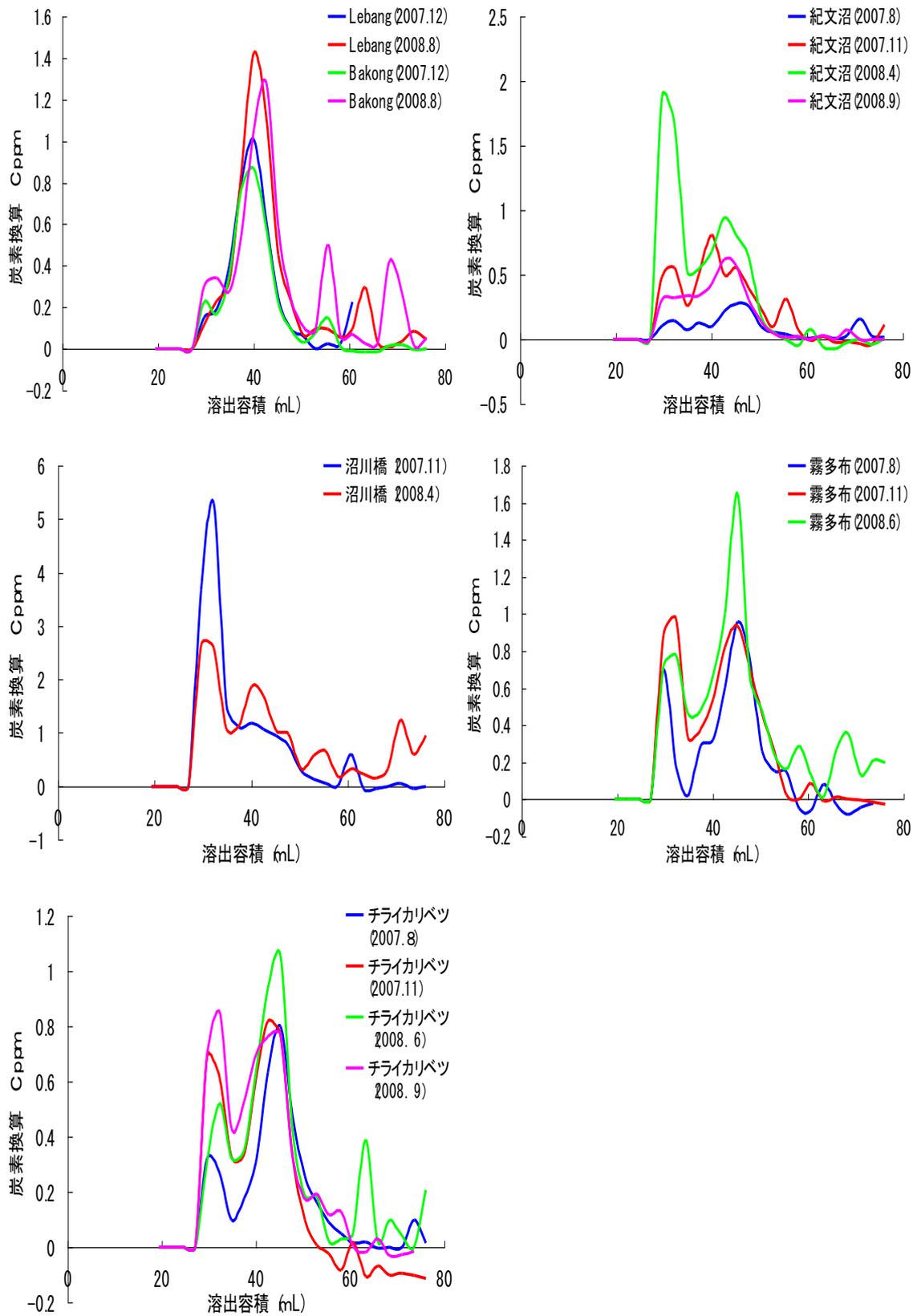
付図 1. フェノール性化合物の溶出曲線



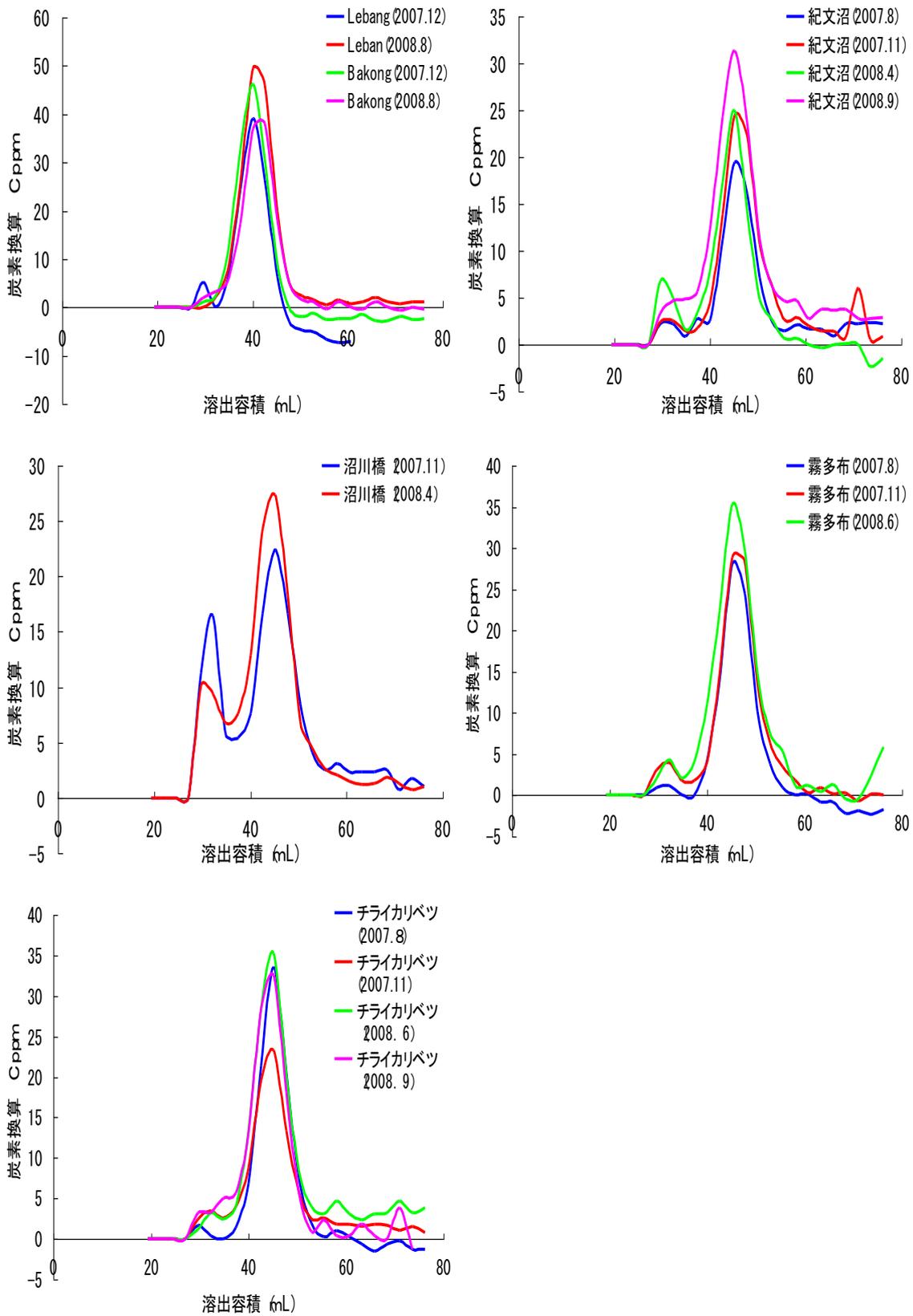
付図 2. タンパク質様物質の溶出曲線



付図 3. フェノール硫酸法による糖溶出曲線



付図 4. アンスロン法による糖溶出曲線



付図 5. 有機炭素の溶出曲線